

非生物ストレスによって誘導される植物病害抵抗性の
分子機構

Molecular Mechanisms of Plant Disease Resistance
Induced by Abiotic Stresses

今田 潔

2015

目次

第1章 総合序論	1
第2章 酸化マグネシウムナノ粒子による植物病害抑制	5
第1節 酸化マグネシウムの地上部病害抑制作用	5
1. 序論	5
2. 材料および方法	7
3. 結果	16
4. 考察	46
第2節 酸化マグネシウムナノ粒子の青枯病抑制作用	49
1. 序論	49
2. 材料および方法	53
3. 結果	65
4. 考察	103
第3章 帯電微粒子水による植物病害抑制	110
1. 序論	110
2. 材料および方法	112
3. 結果	118
4. 考察	127
第4章 405 nm 波長光による植物病害抑制	130
1. 序論	130
2. 材料および方法	132
3. 結果	137
4. 考察	150
第5章 総合考察	153
摘要	156
Summary	159
引用文献	162
謝辞	180
本論文の基礎となった学会誌公開論文リスト	181

第1章 総合序論

現在世界人口は 70 億人を突破し、今後も飛躍的に増加し続けることが予想されている。また中国などでは経済の発展に伴って、特に都市部近郊では工業団地や住宅地が増える反面農地が減少し、さらに食肉や乳製品に対する需要増から直接消費用ではなく畜産用に生産される穀物が増加しており、現在食料輸入率は増加傾向にある。また途上国においては、各国からの援助により様々な品種、肥料が導入され、生産増が図られているものの病虫害対策が十分ではなく、収量の大きな損失につながっている。これらのことから今後世界的に食料不足が深刻化することが危惧されているが、需要が高まる食料をどのようにして安定的かつ効率的に確保していくのか、現在非常に大きな課題となっている。安定的な食料生産を行うためには、作物の栽培や貯蔵過程において病原菌の防除が必須となる。これまで様々な病原菌防除技術が工夫・開発されてきたが、効果、省力、あるいは簡便性の面で最も優れているのは化学農薬による防除である。しかしながら、化学農薬の大量使用は、人体への影響、農薬耐性菌の出現、生態への過剰な負荷、あるいは残留化学農薬による食品の汚染など、無視できない問題の原因となっている。従来は先進国における化学農薬への依存が問題となっていたが、近年は発展途上国においても同様の問題が広がっている。

このような背景から、様々な防除技術を組み合わせることによって化学農薬の使用量を減らし、食品と環境の安全性に対するリスクをできるだけ減らす防除体系（総合的病虫害・雑草管理 Integrated Pest Management : IPM）が推進されている（農林水産省 2005）。IPM を実現するためには環境に負荷を与えない化学農薬、あるいは化学農薬以外の防除技術の開発・発展が重要なポイントとなる。たとえば、植物に様々な非生物ストレスを与えることによって植物病原菌に対する抵抗性反応を誘導する技術も、環境に負荷を与えない防除技術として注目されている。

アシベンゾラル S メチルやプロベナゾール、植物生育促進性根圏細菌（PGPR）や同系状菌（PGPF）などの抵抗性誘導剤を筆頭に、植物が本来もっている抵抗性誘導機構を利用した病害防除技術が近年注目されている。これらは環境への負荷が少なく、また植物が本来持っている抵抗性誘導機構を利用したものであるため薬剤耐性菌の出現の可能性は非常に少ないと考えられている。Syngenta Crop Protection の開発した抵抗性誘導剤であるアシベンゾラル S メチルは糸状菌から

細菌病、ウイルス病に至る幅広い防除範囲を持っており、例えばタバコの *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*、*Cercospora nicotiana* および *Alternaria alternata* に対する抵抗性を誘導し、発病を阻害する (Cole, 1999; Perez *et al.*, 2003; Vallad and Goodman 2004)。プロベナゾールは明治製菓で開発され、主に *Magnaporthe oryzae* が引き起こすイネいもち病の防除に用いられている抵抗性誘導剤で、白葉枯病の病原菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* など他のいくつかの病原菌に対する抵抗性誘導作用も報告されている (Iwata, 2001)。重要なこととして、本剤は 1970 年代から使用されているにもかかわらず、*M. oryzae* の本剤に対する耐性菌は出現していない (Iwata, 2001)。イネに処理した場合、プロベナゾールは根から吸収されたのちに全身へ移行し、処理後 40 - 70 日の間いもち病の防除効果を発揮する (Sreeja, 2014)。その抵抗性誘導作用には病原菌認識後の活性酸素種 (ROS) 蓄積やフェニルプロパノイド経路の活性化および植物ホルモンのサリチル酸 (SA) 蓄積が重要な役割をはたしている (Sreeja, 2014)。

抵抗性誘導剤以外にも、植物に病害抵抗性を誘導する非生物ストレスが報告されている。リン酸塩は、*Colletotrichum lagenarium* が引き起こすキュウリ炭疽病の発病を抑制する (Gottstein and Kuc, 1989)。キュウリをリン酸で処理すると、病原菌に対する抵抗性がキュウリに誘導される (Mucharromah and Kuc, 1991)。このようなキュウリにおけるリン酸誘導性病害抵抗性には、細胞内における ROS の迅速な発生と、それに伴う局所的細胞死が関与している (Orober *et al.*, 2002)。Orober ら (2002) は、リン酸処理によって増加する SA が局所的および全身的な抵抗性反応に関与することを報告している。

以上のように、非生物ストレス抵抗性誘導物質は、環境負荷が少なく、薬剤耐性菌出現の懸念も少ない優れた病害防除技術であるが、その選抜には多大な時間と経費を要するため、新規の抵抗性誘導剤の開発はあまり進んでいない。

植物は、病原菌の感染、昆虫や草食動物による食害、生育環境の変動など常に様々なストレスにさらされている。これらのストレスに適応するため、植物は様々な生体内シグナル伝達ネットワークを介した応答を行っており、植物病原菌に対する防御メカニズムとして病原菌の接触あるいは侵入後に誘導される誘導抵抗性を備えている。細胞壁成分や分泌タンパク質などの微生物が共通に持つ生体構成物質 (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) の認識は、PAMPs-triggered immunity (PTI) と呼ばれる多くの微生物種に対する普遍的な抵抗性反応を引き

起こす (Jones and Dangl, 2006; Spoel and Dong, 2012)。また、植物は傷害ストレスの結果として生じた自己分子を認識して PTI と類似した抵抗性反応を引き起こす damage-associated molecular patterns (DAMPs) 由来の誘導抵抗を備えている。これらの普遍的な抵抗性誘導機構に加えて、病原菌が分泌する特異的なエフェクタータンパク質の認識によって引き起こされる effector-triggered immunity (ETI) と呼ばれる強力な抵抗性反応が存在する (Jones and Dangl, 2006)。感染部位では重要な初期防御応答として ROS および活性窒素種 (RNS) 生成に伴う過敏反応 (HR) が生じる (Romero-Puertas and Delledonne, 2003; Zurbriggen *et al.*, 2009)。同様に、乾燥などの環境ストレスも植物に非生物ストレスとして作用し、多くのケースで植物体内の ROS 発生を誘導する (Smirnoff, 1998)。

一般に、過剰な ROS はその高い反応性に起因する細胞毒性によって病原菌の進展を制限する。その一方、蓄積した ROS は植物体内における抵抗性シグナル因子としても働き、pathogenesis-related protein (PR) 遺伝子発現の誘導を介した局所的・全身的な抵抗性反応において重要な役割を果たしている (Henry *et al.*, 2013)。植物ホルモンの SA、ジャスモン酸 (JA) およびエチレン (ET) は抵抗応答における重要なシグナル因子であり (Robert-Seilanianantz *et al.* 2011)、SA 依存的なシグナル伝達は主にバイオトロフィックな病原菌に対して、そして JA/ET 依存的なシグナル伝達は主にネクロトロフィックな病原菌に対する抵抗性に深く関与している (Kunkel and Brooks, 2002; Niki *et al.*, 1998)。

上に述べたように、新規の抵抗性誘導剤の開発や実用化はあまり進んでいない。そこで本研究では、ヒトに対する安全性が確認され、すでに色々な場面で人間生活に利用されている物質や道具の中から、非生物ストレスとして植物に病害抵抗性を誘導できるポテンシャルを持ったものに着目し、それらの病害抵抗性誘導を確認するとともに、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

本研究では、非生物ストレスとして、酸化マグネシウム (MgO) ナノ粒子、静電霧化微粒子水、および 405 nm 波長光に注目した。MgO ナノ粒子は細菌および糸状菌に対する抗菌性を有しており (Jin and He, 2011; Wani and Shah, 2012)、その抗菌活性には MgO 粒子表面から放出される ROS の関与が示唆されている (Sawai *et al.*, 1996; Sawai and Yoshikawa, 2004)。静電霧化微粒子水は、その成分として $O_2^{\cdot -}$ 、ヒドロキシルラジカル (OH^{\cdot})、および過酸化水素などの ROS とともに RNS である一酸化窒素 (NO) 含んでおり (Shimokage *et al.*, 2005;

Yamauchi *et al.*, 2007; Yamauchi *et al.*, 2014)、抗ウイルス活性および細菌の増殖抑制作用を有することが明らかになっている (Asano *et al.*, 2010)。また、発光ダイオード (Light emitting diode: LED) を光源とした 405 nm 波長光は、複数種のヒト病原細菌に対する抗菌活性を示し (Maclean *et al.*, 2008; Endarko *et al.*, 2012)、その抗菌活性には多くの真核生物および原核生物に共通して保存されている内在性の光増感物質を介した ROS の発生が関与している (Ashkenazi *et al.*, 2003; Castano *et al.*, 2004)。これらの 3 者に共通する性質は、微生物に対して抗菌性を直接的あるいは間接的な ROS 発生を促し、結果として抗菌活性を示すことである。また、これらはいずれも人体および環境への悪影響が非常に少ないという長所を有している。

本研究では、MgO ナノ粒子、静電霧化微粒子水、および 405 nm 波長光の病害抑制作用を確認するとともに、これらの非生物ストレスが、ROS あるいは NO の発生を介して植物に作用し、病害抵抗性を誘導するという仮説を立てて実験を行った。さらに、これら 3 種類の非生物ストレスの病害抵抗性誘導の分子メカニズムを解析し、共通点および相違点を明らかにした。

第2章 酸化マグネシウムナノ粒子による植物病害抑制

第1節 酸化マグネシウムの地上部病害抑制作用

1. 序論

近年、無機ナノ粒子の非常に強い抗菌性が注目されている。例えば、銀 (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009)、銅 (Cioffi *et al.*, 2005) および酸化チタン (Kwak *et al.*, 2001) のナノ粒子は、いずれも真菌および細菌に対して非常に強い抗菌作用を示す。しかしながら、これらの金属ナノ粒子は、製造上のコストや環境への負荷などの理由によりその使用範囲は限定的である。一方、酸化カルシウム (CaO)、酸化亜鉛 (ZnO) および酸化マグネシウム (MgO) のナノ粒子は生物に必須のミネラル成分であるため、環境への負荷が少なく、さらに製造コストが非常に低いという利点がある。これらの酸化金属のグラム陽性およびグラム陰性細菌に対する抗菌活性については多くの報告があるが (Dizaj *et al.*, 2014; Sawai and Yoshikawa, 2004; Vidic *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2010)、一方で糸状菌に対する抗菌活性に関する報告例は少ない。わずかに、MgO および ZnO のナノ粒子が植物病原糸状菌の *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* および *Mucor plumbeus* の孢子発芽を抑制することや (Wani and Shah, 2012)、ZnO ナノ粒子が *Botrytis cinerea* および *Penicillium expansum* に対して強い抗菌活性を持つこと (He *et al.*, 2011) が知られている程度である。

界面活性剤は、同一分子内に親水基と疎水基を持ち、殺菌剤、殺虫剤、除草剤といった農薬の効果を最大限に引き出すための展着剤として用いられる。その中でも非イオン性界面活性剤は最も広く使われている界面活性剤で、糖エステル型、脂肪酸エステル型、アルコール型、アルキルフェノール型、ポリオキシエチレン型などがある。本研究では、実際の農業現場で MgO ナノ粒子を適用する場合を想定し、これら界面活性剤を MgO ナノ粒子に添加した際における抗菌活性の変化を調べた。

MgO などの酸化金属ナノ粒子は、多くのエッジ/コーナー構造と反応性の高い表面構造を特徴とした結晶構造粒子であり、その微小なサイズに起因した広い表面積を持っている (Klabunde *et al.* 1996; Stoimenov *et al.* 2002)。これらの特徴的な構造により、MgO、CaO および ZnO ナノ粒子は表面構造上に $O_2^{\cdot-}$ や H_2O_2 を発生

させ、生じた ROS が微生物に対する抗菌性に重要な役割を果たしていると考えられている (Sawai *et al.*, 1996; Sawai and Yoshikawa, 2004)。また、ROS は植物の病原菌に対する初期応答において重要なシグナル因子として働き、*PR* 遺伝子発現の誘導などの局所的・全身的な抵抗性反応を引き起こす (Henry *et al.*, 2013)。植物ホルモンの SA、JA および ET は植物の病原菌に対する抵抗応答に関与するシグナル因子であり (Robert-Seilanianantz *et al.* 2011)、SA 依存的なシグナル伝達は主にバイオトロフィックな病原菌に対して、そして JA/ET 依存的なシグナル伝達は主にネクロトロフィックな病原菌に対する抵抗性に深く関与している (Kunkel and Brooks, 2002)。

本研究では MgO ナノ粒子の植物病原糸状菌に対する抗菌性を明らかにするとともに、その抗菌性における ROS の関与を調べた。加えて、MgO ナノ粒子のイチゴ炭疽病の発病抑制効果、およびシロイヌナズナにおける *B. cinerea* 感染抑制効果を調べた。また、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて MgO ナノ粒子処理による局所的・全身的な抵抗性誘導作用を調べた。

2. 材料および方法

1. 酸化金属材料と酸化マグネシウムナノ粒子の電子顕微鏡観察

1-1. 酸化金属

宇部マテリアルズ製の酸化マグネシウム UCM250 および 500A を用いた。各 MgO ナノ粒子の製造は以下のように行った。すなわち、UCM250 は $\text{Mg}(\text{OH})_2$ を入口 550°C～出口 700°Cで、外熱式ロータリーキルンに数分間滞留焼成し、焼成後空冷することで得られた。500A は熔融蒸発した金属 Mg に気体酸素を噴射（気相法）することで得られた。実験には酸化亜鉛（ZnO）（ $\sim 5\ \mu\text{m}$, 265-00971; $0.02\ \mu\text{m}$; Wako）および酸化カルシウム（CaO）（036-13572 ; Wako）も用いた。以下に示す全ての実験では、酸化金属懸濁液は超音波処理を数分間行った後に供試した。

1-2. 酸化マグネシウム粒子の TEM 観察

UCM250 および 500A (5 mg) を 99% EtOH (10 ml) に懸濁し、銅グリッドに滴下した。Transmission Electron Microscope (TEM) 観察は、JEM-2100 (JEOL, Tokyo, Japan) を使用し、加速電圧 200 kV で行った。

2. 供試菌

Botrytis cinerea

試験に用いた *B. cinerea* N-2 菌株は、山口県農林総合技術センターにおいて栽培されたトマトに発生した灰色かび病罹病個体から単離されたもので、ジャガイモ煎汁寒天 (PDA) 斜面培地により 4°Cで保存した。保存菌株の菌叢を PDA 平板培地に接種後、25°C、暗黒下で 14 日間程度培養し、孢子形成を行った。孢子形成した培地に滅菌水を適量注ぎ、スプレッダーを用いて慎重に孢子を洗い落とした。この孢子懸濁液をボルテックスした後、滅菌済みの 2 重ガーゼで濾過し、トーマ氏血球計算盤を用いて孢子濃度を測定した。植物体へ接種する際は、2 倍に希釈したジャガイモ煎汁液体培地 (PDB) に懸濁した *B. cinerea* 孢子を用いた。

Colletotrichum gloeosporioides, *C. destructivum* および *C. scovillei*

当研究室保存菌である *Colletotrichum gloeosporioides* 58 菌株、山口県農林総合技術センターの鍛冶原氏から分譲された *C. scovillei* 1 菌株を用いた。PDA 斜面培

地で保存された菌株の菌叢を PDA 平板培地に接種後、25℃、暗黒下で 7 日間程度培養し、胞子を形成した。胞子形成した培地に滅菌水を適量注ぎ、スプレッダーを用いて慎重に胞子を洗い落とした。この胞子懸濁液をボルテックスした後、滅菌した 3 重ガーゼで濾過し、トーマ氏血球計算盤を用いて胞子濃度を測定した。

Fulvia fulva

当研究室保存菌である *Fulvia fulva* 1 菌株は、PDA 斜面培地により 4℃で保存した。保存菌株の菌叢を PDA 平板培地全体に塗布し、25℃、暗黒下で 10 日間程度培養することで胞子を形成させた。胞子形成した培地に Tween20 を 0.1% (v/v) 含む滅菌水を適量注ぎ、スプレッダーを用いて慎重に胞子を洗い落とした。この胞子懸濁液をボルテックスした後、滅菌した 3 重ガーゼで濾過し、トーマ氏血球計算盤を用いて胞子濃度を測定した。

Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici

当研究室保存菌である *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* 38 菌株は、PDA 斜面培地により 4℃で保存した。保存菌株の菌叢を PDB に接種し、25℃、120 rpm で 5 日間程度培養した。培養液を 3 重ガーゼで濾過、濃縮後、滅菌水で 2 回洗浄し、トーマ氏血球計算盤を用いて胞子濃度を測定した。

Magnaporthe oryzae

山口県農林総合技術センターの鍛冶原氏から分譲された *Magnaporthe oryzae* 1 菌株は、PDA 斜面培地により 4℃で保存した。保存菌株の菌叢をオートミール平板培地（オートミール 50 g/l、スクロース 20 g/l、寒天 15 g/l）に接種後、25℃、暗黒下で 14 日間程度培養し、胞子形成を行った。胞子形成した培地に滅菌水を適量注ぎ、スプレッダーを用いて慎重に胞子を洗い落とした。この胞子懸濁液をボルテックスした後、滅菌済みの 2 重ガーゼで濾過し、トーマ氏血球計算盤を用いて胞子濃度を測定した。

3. 供試植物

供試植物として、イチゴ (*Fragaria* × *ananassa*) (品種：章姫) およびシロイヌナズナ (エコタイプ：col-0) を用いた。イチゴ苗は株式会社花の海より購入した株を

使用し、実験に用いるまでビニールハウスで生育させた。シロイヌナズナは人工培土（バーミキュライト：パーライト=1：1）に植えつけた後、25℃、12時間の明期条件（光量子束密度 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で30日間生育させた個体を以降の実験に用いた。

3. 植物病原糸状菌に対する静菌・殺菌作用の検定

3-1. MgO ナノ粒子の植物病原糸状菌孢子発芽および付着器形成に及ぼす影響

3-1-1. 酸化金属処理による *B. cinerea* 孢子発芽抑制作用

B. cinerea の孢子懸濁液（最終濃度 1×10^5 個/ml）および各種酸化金属（最終濃度 100 ppm、滅菌水に溶解）懸濁液を Spezieller Nährstoffarmer (SN)（グルコース 0.2 g/l、スクロース 0.2 g/l、 KH_2PO_4 1.0 g/l、 KNO_3 1.0 g/l、 MgSO_4 0.5 g/l、 KCl 0.5 g/l）液体培地に混合した。コントロールとして滅菌水（pH 11、NaOH で調整、90 μl ）を孢子懸濁液および SN 液体培地に混合した。混合液（50 μl ）は 96 穴マイクロプレートに分注した後、暗黒下、25℃で18時間静置した。静置後、*B. cinerea* 孢子発芽率を倒立顕微鏡（Olympus IX70 ; Olympus）で計測した。

3-1-2. MgO ナノ粒子濃度依存的な *B. cinerea* 孢子発芽抑制作用の検定

B. cinerea の孢子懸濁液（最終濃度 1×10^5 個/ml）に各濃度の UCM250 あるいは 500A（滅菌水に溶解）を混合後、SN 液体培地に加えた。コントロールとして滅菌水（pH 11、NaOH で調製、90 μl ）もしくは MgO ナノ粒子を除いた粒子除去液を孢子懸濁液に混合したものをを用いた。この際、各濃度の MgO ナノ粒子懸濁液を $13,000 \times g$ で遠心分離後、0.45 μm のセルロース膜（Advantec）でフィルター濾過を行うことで粒子除去液を得た。混合液（50 μl ）は 96 穴マイクロプレートに分注した後、暗黒下、25℃で18時間静置した。静置後、*B. cinerea* 孢子発芽率を倒立顕微鏡（Olympus IX70 ; Olympus）で計測した。

3-1-3. *Colletotricum* 属菌に対する孢子発芽および付着器形成阻害作用

C. gloeosporioides および *C. scovillei* の孢子懸濁液（ 1×10^6 個/ml、1 μl ）に各種酸化金属（9 μl ）を混合した。コントロールとして滅菌水（pH 11、NaOH で調整、90 μl ）もしくは上記のように作製した粒子除去液を孢子懸濁液に混合したものをを用いた。混合液をポリスチレンプレートに滴下し、湿室状態で暗黒下、25℃で静置

した。倒立顕微鏡 (Olympus IX70 ; Olympus) を用いて、各タイムピリオドにおける孢子発芽率および付着器形成率を測定した。

3-1-4. MgO ナノ粒子処理による *B. cinerea* 孢子内 ROS の蓄積

UCM250 の懸濁液 (滅菌水に溶解、最終濃度 100 ppm) と *B. cinerea* の孢子懸濁液 (最終濃度 1×10^5 個/ml) を SN 培地に混合した。混合液 (50 μ l) を 96 穴マイクロプレートに分注した後、ジヒドロローダミン 123 (DHR123 ; 1mg/ml) を混合したのち、温室状態で暗黒下、25°C で静置した。2 時間後、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; BIORIVO, Keyence) を用いて蛍光発生を観察した。ROS 依存的な赤色の励起光の検出は TRITC (励起波長 540/25、吸収波長 605/55) BZ フィルタを用いて行った。

3-1-5. MgO ナノ粒子処理による *C. gloeosporioides* 菌糸内 ROS の蓄積

C. gloeosporioides 孢子懸濁液 (最終濃度 1×10^5 個/ml) をジャガイモ煎汁液体 (PDB) 培地に接種後、恒温器を用いて 25°C、120 rpm で培養した。14 時間後、発芽した菌体を適量回収し、DHR123 (1 mg/ml) を混合した後 96 穴マイクロプレートに分注 (100 μ l) した。UCM250 の懸濁液 (滅菌水に溶解、最終濃度 100 ppm) に混合した後、蛍光顕微鏡 (BZ-9000 ; BIORIVO, Keyence) を用いて経時的な蛍光発生を観察した。ROS 依存的な赤色励起光の検出は TRITC BZ フィルタ (励起波長 540/25、吸収波長 605/55) を用いて行った。

3-1-6. MgO ナノ粒子処理による *C. gloeosporioides* 菌糸細胞死

C. gloeosporioides 孢子懸濁液 (最終濃度 1×10^5 個/ml) をジャガイモ煎汁液体 (PDB) 培地に接種後、恒温器を用いて 25°C、120 rpm で 14 時間培養した。発芽した菌体を適量回収し、各濃度の 500A 懸濁液 (滅菌水に溶解) に混合した後 96 穴マイクロプレートに分注 (100 μ l) した後、恒温器を用いて 25°C、120 rpm で 6 時間培養した。培養後、エバンスブルー染色液 (最終濃度 5mg/ml) で 5 分間染色した後、エバンスブルー陽性 (青色) を示す死細胞を倒立顕微鏡 (Olympus IX70; Olympus) で確認した。

3-2. 界面活性剤添加時の植物病原糸状菌に対する殺菌作用の検定

3-2-1. 界面活性剤・MgO ナノ粒子併用処理による植物病原糸状菌殺菌作用

最終濃度 0.1% の UCM250 (w/v、蒸留水に溶解) 懸濁液および蒸留水 (pH 11、NaOH で調整) に *C. destructivum*、*C. gloeosporioides*、*F. fulva*、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* および *M. oryzae* の孢子懸濁液 (最終濃度 5×10^5 個/ml) を混合した。混合溶液には界面活性剤として各濃度の Tween20、Tween80、TritonX-100 および Nonidet P40 を混合した。コントロールとして界面活性剤を含まない蒸留水を加えた。混合液を暗黒下、25℃で 3 時間静置した後、エバンスブルー染色液 (最終濃度 5 mg/ml) を加えた。30 分間染色した後、エバンスブルー陽性となる死孢子数を計測した。

3-2-2. MgO ナノ粒子濃度と *C. destructivum* 殺菌作用の関係

C. destructivum の孢子懸濁液 (最終濃度 5×10^6 個/ml) に各濃度に調製した UCM250 および 500A の懸濁液を混合した。混合溶液には界面活性剤として TritonX-100 (最終濃度 0.1%、v/v) を混合した。混合液を暗黒下、25℃で 3 時間静置した後、上記の方法で死孢子数を計測した。

3-2-3. TritonX-100 濃度と *C. destructivum* 殺菌作用の関係

C. destructivum の孢子懸濁液 (最終濃度 5×10^6 個/ml) に最終濃度 0.5% (w/v、蒸留水に溶解) の UCM250 懸濁液を混合した。混合溶液には界面活性剤として各濃度の TritonX-100 を混合した。コントロールとして TritonX-100 を含まない蒸留水を加えた。混合液を暗黒下、25℃で 3 時間静置した後、エバンスブルー染色液 (50 mg/ml、10 μ l) を加えた。30 分間染色した後、上記の方法で死孢子数を計測した。

3-2-4. 酵素阻害剤、ROS 除去剤およびキレート剤の *C. destructivum* 殺菌作用に及ぼす影響

C. destructivum の孢子懸濁液 (最終濃度 5×10^6 個/ml) に最終濃度 0.1% (w/v、蒸留水に溶解) の UCM250 懸濁液を混合し、各濃度の Histidin (OH^\cdot 除去)、Tiron (O_2^\cdot 除去)、cPTIO (NO 除去)、アスコルビン酸 (ROS 除去)、DMTU (H_2O_2 除去)、DPI (NADPH オキシダーゼ阻害)、Nifedipin (カルシウムチャネル阻害) および BAPTA (カルシウムイオンキレート) をさらに混合した。混合溶液には界面活性剤として TritonX-100 (最終濃度 4 mM) を混合した。混合液を暗黒下、25℃で 3 時

間静置した後、エバンスブルー染色液 (50 mg/ml、10 μ l) を加えた。30 分間染色した後、上記の方法で死孢子数を計測した。

4. MgO ナノ粒子処理による *A. thaliana* に対する *B. cinerea* の感染阻害作用

4-1. 局所的および全身的な *B. cinerea* 感染阻害作用

30 日間生育させた *A. thaliana* の中位葉に最終濃度 0.1% の酸化金属 (UCM250、500A、CaO あるいは ZnO (0.02 μ m)) 懸濁液 (w/v、蒸留水に溶解) を 5 μ l 滴下した。その後さらに 3 日間生育させた後、MgO ナノ粒子懸濁液を滴下した部位 (Local leaf) および対角部位の中位葉 (Systemic leaf) に *B. cinerea* 孢子懸濁液 (1×10^6 個/ml) を 5 μ l ずつ接種し、25°C、過湿条件で静置した。接種 2 日後にロゼット葉を回収し、病斑直径を計測した。また、回収したロゼット葉は以下に示すように *B. cinerea* の染色および抵抗性関連遺伝子発現の解析に用いた。

回収したロゼット葉は FAA 固定液 (ホルマリン 45%、酢酸 2.5%、EtOH 45%) に 3 時間以上浸漬した後、抱水クロラル (250 mg/l) で脱色した。ラクトフェノールコットンブルー染色液 (フェノール 8 g、乳酸 8 g、グリセリン 16 g、コットンブルー 0.02 g、蒸留水 8 ml) を数滴垂らし、ロゼット葉上の *B. cinerea* コロニーを光学顕微鏡 (Olympus BH-2; Olympus) で観察し、孢子発芽率を計測した。

4-2. MgO ナノ粒子処理による局所的および全身的な抵抗性関連遺伝子発現

上記 4-1 と同様の条件による各種酸化金属処理 2 日後の *A. thaliana* ロゼット葉を回収した。さらに、同様の条件で UCM250 あるいは 500A を処理した後、*B. cinerea* を接種して 2 日後の *A. thaliana* ロゼット葉を各 3 個体分回収し、液体窒素で凍結させた後 -80°C で保存した。総 RNA はセパゾール RNAI Super (Nacalaitesque) を用いて抽出した。1 本鎖 cDNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo) を用いて、総 RNA 500 ng/10 ml の濃度で合成した。リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) により、各抵抗性関連遺伝子をターゲットとしたプライマー (Table 1) を用いて行った。また、キャリブレーター遺伝子として β -アクトチン遺伝子を用いた。PCR は各プライマー 0.3 μ M および等量に希釈した cDNA 1 μ l を含む合計 20 μ l の反応溶液により、95°C、60 秒を 1 サイクル、95°C、15 秒および 58°C、60 秒を 40 サイクルの反応条件で 7300 system (Applied Biosystems) を用いて行った。ターゲット遺伝子の相対発

現値は $\Delta\Delta\text{CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) により求めた。これらの実験はメーカープロトコルに準じて行った。

Table 1. Oligonucleotide primers for analyzing the defense-related gene expression.

Taget gene	Primer pair	Accession No.	Sequence (5'-3')
PR1	AtPR1-F	M90508	CTCGGAGCTACGCAGAACAA
	AtPR1-R		TTCTCGCTAACCCACATGTTCA
PR2	AtPR2-F	NM115586	AGTCGGGACGAGTGTGGAAA
	AtPR2-R		GCCTTCTCGGTGATCCATTC
PR3	AtPR3-F	NM112085	CGCCACGAGGAAGAAGGA
	AtPR3-R		TATGGTCCGTCTGGTGCTGTAG
PR4	AtPR4-F	NM111344	ACAACAATGCGGTCGTCAAG
	AtPR4-R		TAGGCCCACTTCCCCAACA
PR5	AtPR5-F	NM106161	GTGTTCATCACAAGCGGCATT
	AtPR5-R		CCGAGCTTGGGTCCTTGAC
PDF1.2	AtPDF1.2-F	NM123809	CACCCTTATCTTCGCTGCTCTT
	AtPDF1.2-R		CTTCTGTGCTTCCACCATTGC
Actin	AtAct-F	NM112764	TCCTCCGTCTTGACCTTGCT
	AtAct-R		ATTTCCCGCTCTGCTGTTGT

5. MgO ナノ粒子のイチゴ炭疽病発病抑制効果

5-1. UCM250 および 500A のイチゴ炭疽病発病抑制効果

生育したイチゴ（本葉 3~4 葉）の地上部を上下逆さにし、1%の UCM250 あるいは 500A (w/v、蒸留水に溶解) 懸濁液中に数秒間浸した後、ビニールハウス内で静置した。コントロールとして 0.1% TritonX-100 (v/v) を含む pH 11 の蒸留水に浸した。MgO ナノ粒子処理 3 日後、1 個体あたり 1 ml の *C. gloeosporioides* 孢子懸濁液 (1×10^5 個/ml) を植物体全体に噴霧接種し、28℃、過湿条件の人工気象器内に 2 日間静置した後、さらに 28℃、相対湿度 70%の条件下で 10 間日以上静置し、発病の進展を観察した。各イチゴ個体の発病度は以下の基準で算出した。0：無発病、1：葉または葉柄に 5 個未満の病斑、2：葉または葉柄に 6 個以上の病斑、3：葉柄が折れているまたは壊死している 4：株全体の萎凋および枯死。

5-2. 界面活性剤添加が MgO ナノ粒子のイチゴ炭疽病発病抑制効果に及ぼす影響の検定

生育したイチゴ（本葉 3~4 葉）の地上部に上記と同様の方法で MgO ナノ粒子処理を行った。この際、1%の UCM250 (w/v) は蒸留水、0.1% (v/v) の Tween20 含有蒸留水または 0.1% (v/v) の TritonX-100 含有蒸留水に懸濁した。*C. gloeosporioides* の接種および発病度の判定は上記と同様に行った。

3. 結果

1. 酸化マグネシウム粒子の TEM 観察

供試した 2 つの MgO ナノ粒子 (UCM250 および 500A) の構造的な特徴を TEM 観察によって観察した。UCM250 は約 100 nm (20 - 200 nm) の平均粒子サイズを示したのに対し、500A はより小さな約 50 nm (10 - 70 nm) を示し、各酸化マグネシウムで異なる平均粒子サイズを示した (Fig. 1A, B)。また、MgO 結晶粒子に特徴的な干渉縞が観察された (Fig. 1B)。

2. MgO ナノ粒子の植物病原糸状菌に対する静菌・殺菌作用

2-1. MgO ナノ粒子の植物病原糸状菌孢子発芽および付着器形成に及ぼす影響

2-1-1. *B. cinerea* に対する孢子発芽抑制作用

各種酸化金属 (UCM250、500A、CaO、ZnO) を *B. cinerea* の孢子に処理した結果、培養 18 時間後の *B. cinerea* 孢子発芽は、MgO ナノ粒子 (UCM250 および 500A) 処理によって顕著に抑制された。また、平均粒子サイズが小さい 500A を処理した際により強い孢子発芽抑制作用がみられた。一方、CaO および ZnO (0.2 μm および 0.05 μm) を処理した *B. cinerea* は水処理区と同程度の孢子発芽率を示し、~10 μm の ZnO を処理された *B. cinerea* はコントロールと比較して有意な発芽抑制作用を示したもののその抑制率は低かった (Fig. 2)。また、MgO 粒子を除いた粒子除去水を処理した際、高濃度の UCM250 (100 ppm) 由来の粒子除去水においても孢子発芽抑制作用は見られなかった (Fig. 3)。さらに、孢子発芽抑制作用の MgO ナノ粒子濃度依存性を調べた結果、UCM250 は 80 ppm 以上の濃度で処理した際に孢子発芽抑制作用を示したのに対し、500A は 60 ppm の濃度で処理した際も顕著な孢子発芽抑制作用を示した (Fig. 4)。

2-1-2. *Colletotricum* 属菌に対する孢子発芽および付着器形成阻害作用

各種酸化金属 (UCM250、500A、CaO および ZnO) をイチゴ炭疽病菌である *C. gloeosporioides* およびピーマン炭疽病菌である *C. scovillei* の孢子に処理し、ポリスチレン上での孢子発芽および付着器形成阻害作用を観察した。その結果、UCM250、500A および ZnO は *C. gloeosporioides* および *C. scovillei* の孢子発芽および付着器形成を顕著に阻害した。MgO ナノ粒子は粒子濃度依存的な抗菌作用

を示し、その際粒子サイズの小さな 500A はより強い抗菌作用を示した。*C. gloeosporioides* に対する胞子発芽および付着器形成阻害作用は Table 2 に、*C. scovillei* に対する胞子発芽および付着器形成阻害作用は Table 3 に示した。

2 - 1 - 3. MgO ナノ粒子処理による糸状菌細胞内 ROS の蓄積および細胞死の誘導

MgO ナノ粒子 (UCM250) を *B. cinerea* の胞子に処理した際の胞子細胞内 ROS 蓄積を DHR123 染色によって検出した。培養 2 時間後、コントロールと比較して MgO ナノ粒子処理区では、*B. cinerea* 胞子細胞内に顕著な ROS の発生が確認された (Fig. 4)。また、MgO ナノ粒子 (UCM250) を *C. gloeosporioides* の菌糸に処理したところ、経時的な菌糸細胞内 ROS 蓄積が確認された。一方、滅菌水あるいは ZnO (0.02 μm) を処理した際は、処理 15 分後においても ROS 蓄積は確認されなかった (Fig. 5)。また、MgO ナノ粒子 (UCM250) を *C. gloeosporioides* に処理した際の菌糸細胞死をエバンスブルー染色で検出したところ、処理 3 時間後において、50 ppm 以上の濃度で MgO ナノ粒子を処理した菌糸に部分的な細胞死が観察された (Fig. 6)。

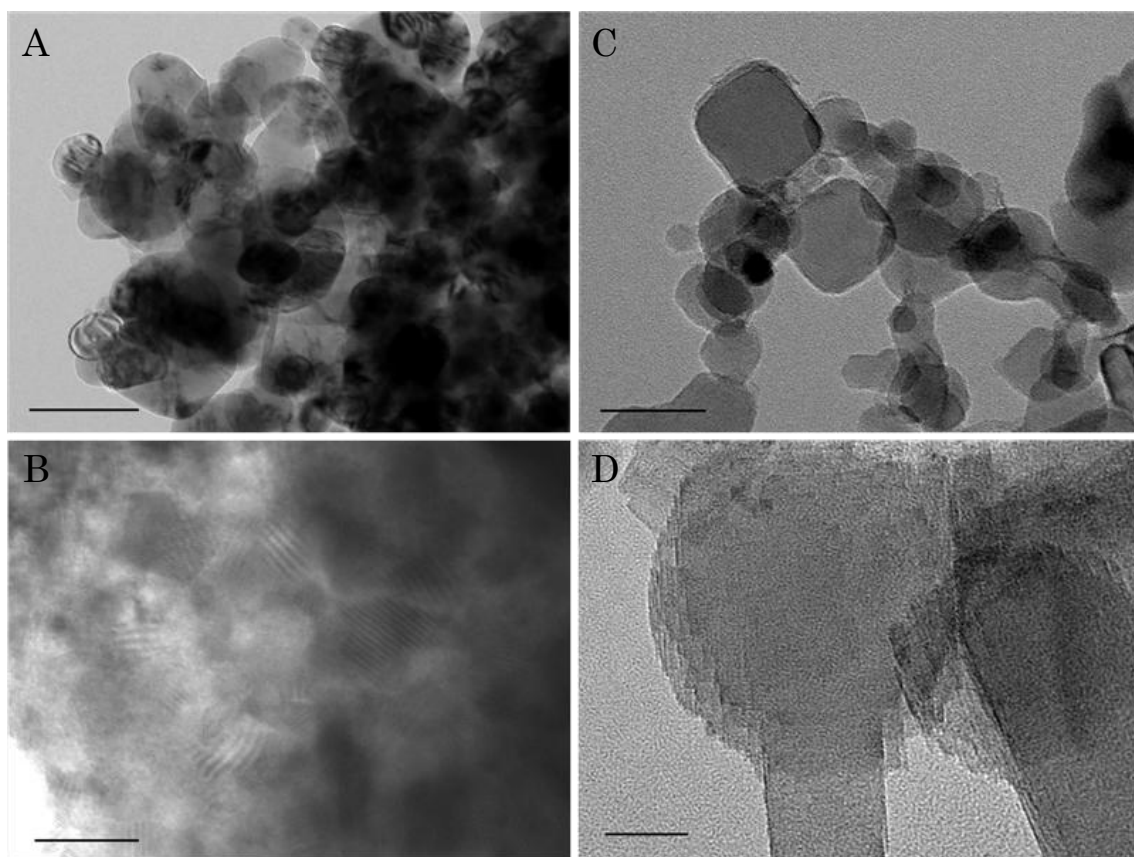


Fig. 1. Transmission electron microscope images of magnesium oxide nanoparticles: UCM250 (A and B) and 500A (C and D). Bars indicate 200 nm (A and C) and 20 nm (B and D), respectively.

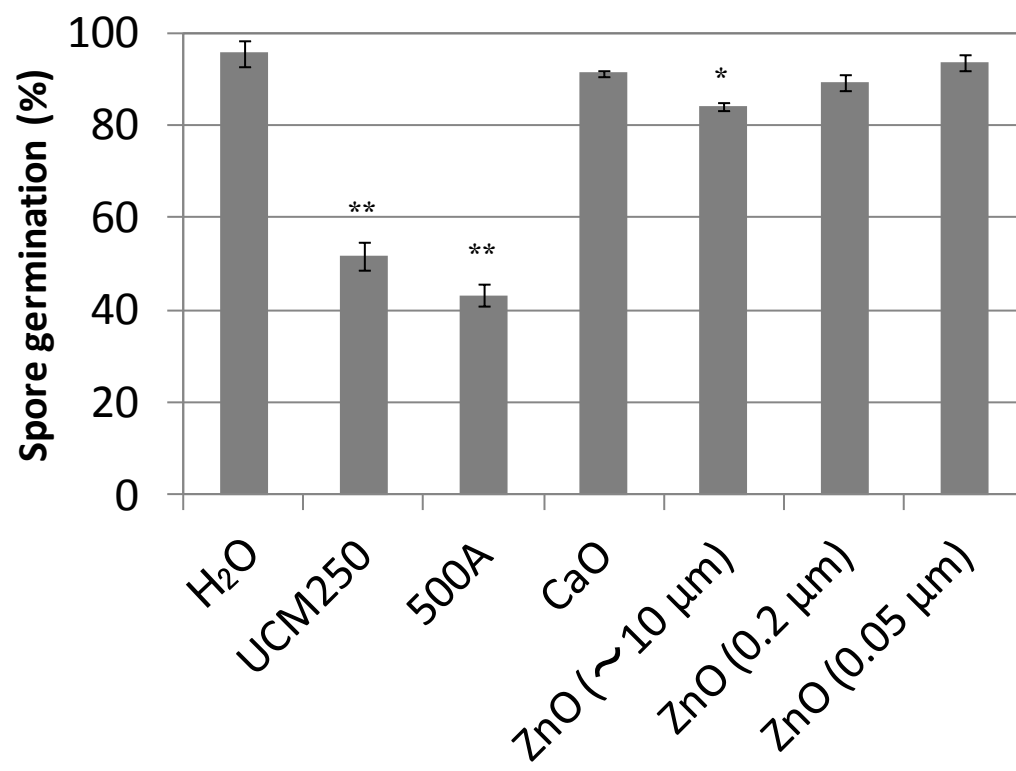


Fig. 2. Effect of metal oxide nano particles on spore germination of *Botrytis cinerea*. Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$, * indicates $P < 0.05$.

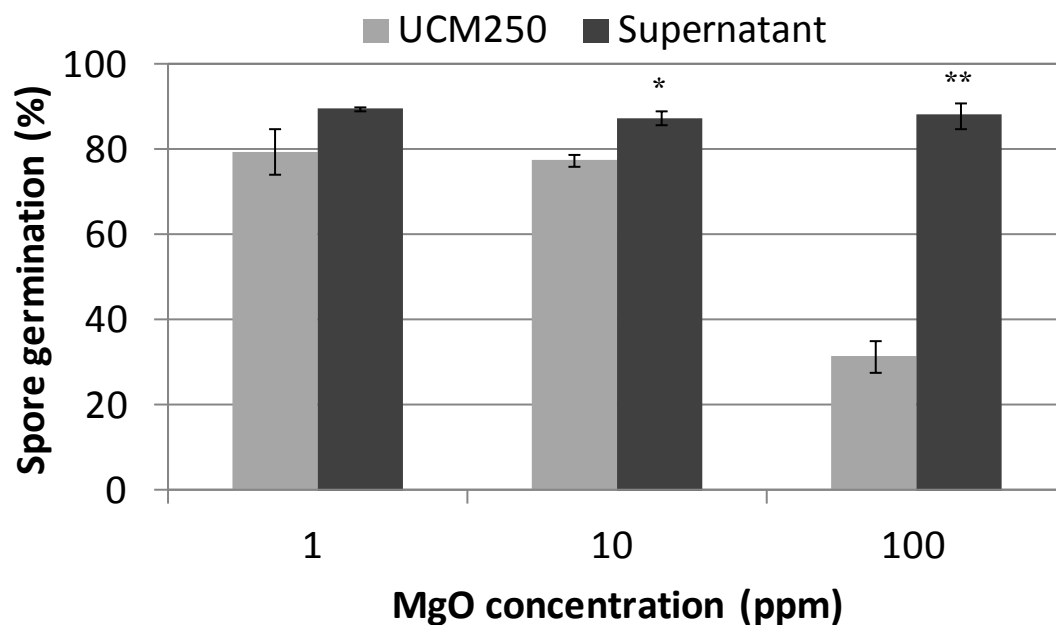


Fig. 3. No effect of supernatant of UCM250 on spore germination of *Botrytis cinerea*. Error bars represent the standard errors (n = 3). Data sets marked with asterisks are significantly different from UCM250, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$, * indicates $P < 0.05$.

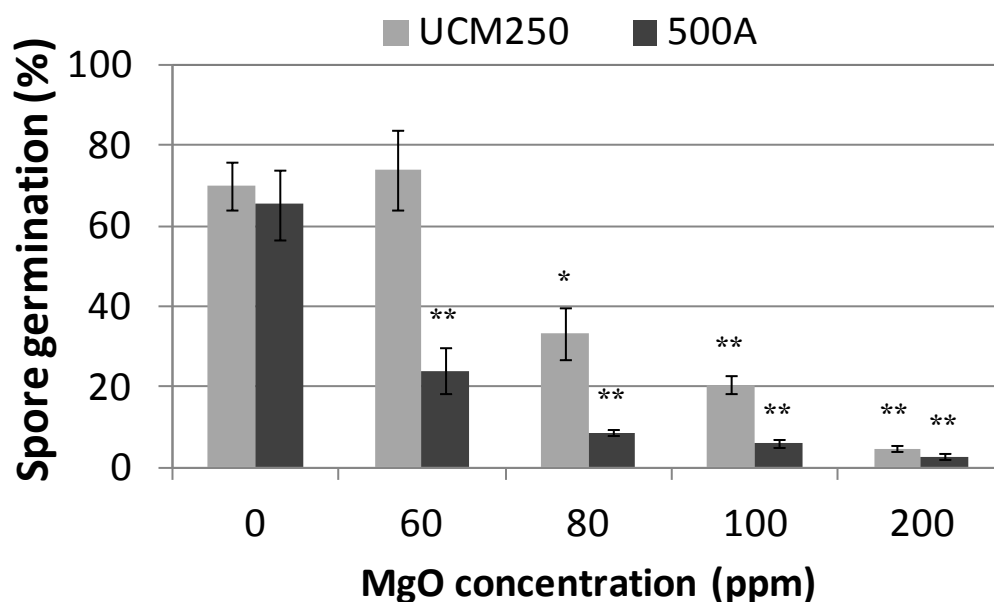


Fig. 3. Concentration-dependent manner of inhibition of *Botrytis cinerea* spore germination by MgO nanoparticles. Error bars represent the standard errors (n = 3). Data sets marked with asterisks are significantly different from 0 ppm, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$, * indicates $P < 0.05$.

Table 2. Antifungal activity of metal oxide nano particles against *Colletotrichum gloeosporioides*.

Material (ppm)		Appressorium formation (%)	Spore germination (%)
H ₂ O	0	73.3±11.4	74.7±11.7
UCM250	1000	6.0±0.7*	22.7±9.3*
	500	14.0±4.2**	63.3±1.8
	100	67.5±10.6	72.1±12.4
	50	80.7±5.7	82.0±6.1
500A	1000	0	4.0±3.1**
	500	1.3±1.3*	8.7±2.7*
	100	15.3±1.3*	43.3±12.3
	50	67.2±7.7	77.5±12.5
CaO	1000	1.3±0.7*	12.0±4.2**
	500	77.3±6.8	86.0±8.0
	100	89.3±1.3	92.7±1.3
	50	62.3±20.1	65.2±20.1
ZnO	1000	0	3.3±0.7*
	500	0	8.0±1.2*
	100	0	13.3±4.1**
	50	0	5.3±1.8*

Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$, * indicates $P < 0.05$.

Table 3. Antifungal activity of metal oxide nano particles against *Colletotrichum scovillei*.

Material (ppm)		Appressorium formation (%)	Spore germination (%)
H ₂ O	0	86.0±5.3	86.7±5.2
UCM250	1000	0	36.0±1.2**
	500	0	59.3±9.4*
	100	54.0±9.9*	62.0±6.4*
	50	83.3±1.8	84.0±1.2
500A	1000	0	2.7±1.8**
	500	0	0.7±0.7**
	100	10.7±4.7**	26.0±3.1**
	50	69.3±5.2	74.7±2.7
CaO	1000	2.1±0.9**	15.3±5.2**
	500	88.0±6.1	91.3±4.7
	100	94.7±1.3	95.3±1.8
	50	93.3±2.7	96.0±1.2
ZnO	1000	0	2.1±0.9**
	500	0	1.3±0.7**
	100	0	5.3±2.4**
	50	4.0±2.0**	4.0±2.0**

Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$, * indicates $P < 0.05$.

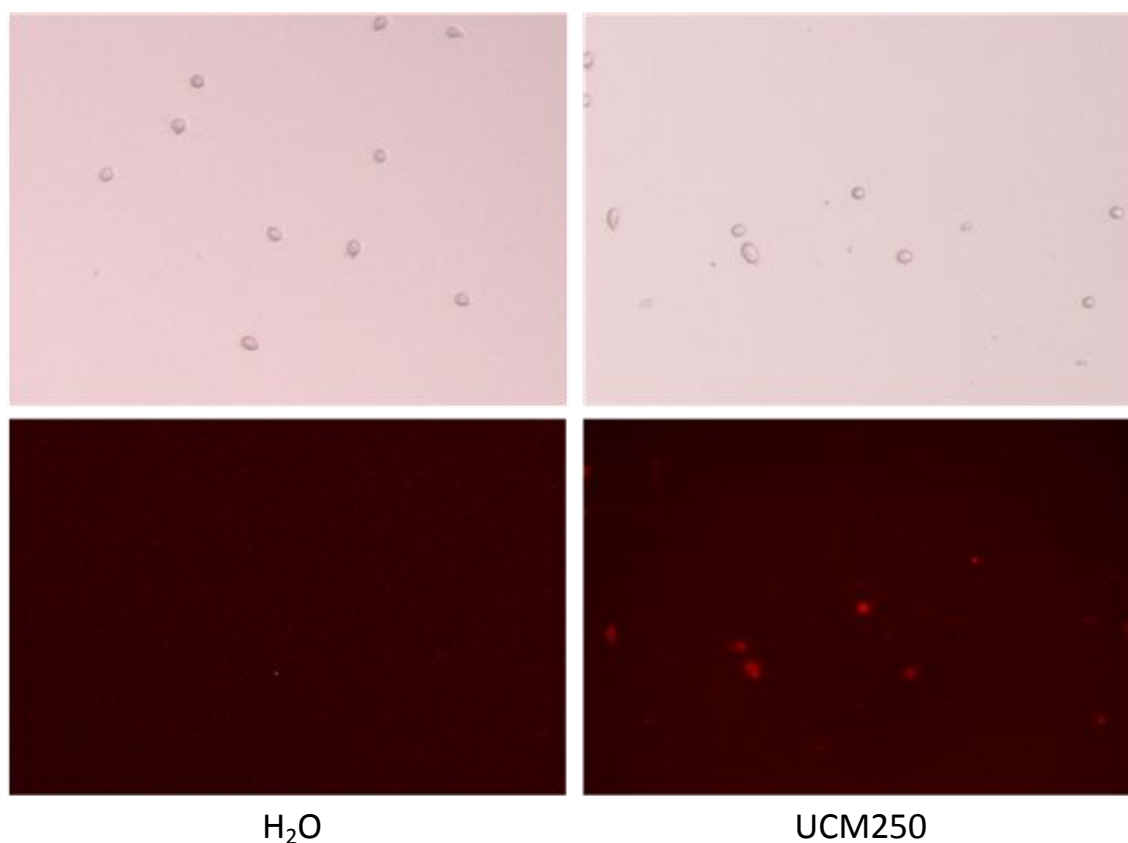


Fig. 4. Induction of ROS accumulation by magnesium oxide nanoparticles in fungal spores of *Botrytis cinerea*. Red fluorescence shows ROS accumulation stained by DHR123. Top panels, light microscopy; bottom panels, fluorescence microscopy.

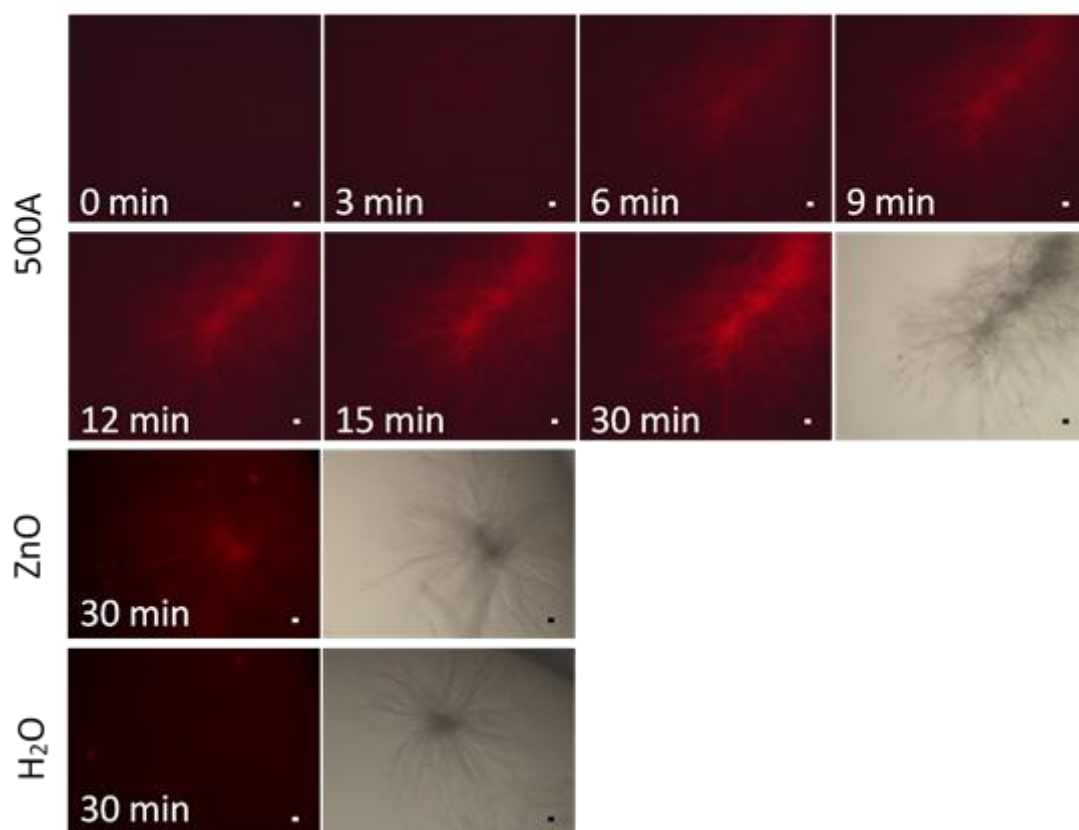


Fig. 5. Induction of ROS accumulation by magnesium oxide nano particles in hyphal cells of *Colletotrichum gloeosporioides*. Red fluorescence shows ROS accumulation stained by DHR123.

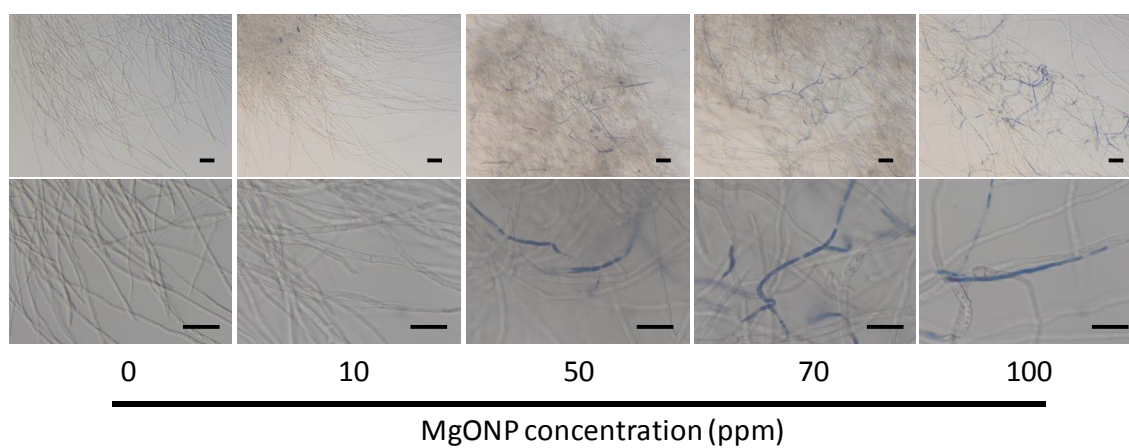


Fig. 6. Induction of fungal cell death by magnesium oxide nano particles (MgONP). After MgONP was treated to hyphae of *Colletotrichum gloeosporioides* for 3 h, hyphal cell death was detected by Evan's blue staining. bars: 50 µm.

2-2. 界面活性剤添加時の植物病原糸状菌に対する殺菌作用

2-2-1. 界面活性剤・MgO ナノ粒子併用処理による植物病原糸状菌殺菌作用

各種界面活性剤 (Tween20、Tween80、TritonX-100 および Nonidet P40) を混合した MgO ナノ粒子 (UCM250) 懸濁液の複数の植物病原糸状菌 (*C. destructivum*、*C. gloeosporioides*、*F. fulva*、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* および *M. oryzae*) に対する殺菌作用をエバンスブルー染色により調べた。TritonX-100 あるいは Nonidet P40 を混合した MgO ナノ粒子は 2 種の炭疽病菌 (*C. destructivum* および *C. gloeosporioides*) 胞子に対して顕著な殺菌作用を示した。一方、*F. fulva*、*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* および *M. oryzae* に対しては、いずれの界面活性剤を混合した MgO ナノ粒子を処理した際においても殺菌作用をほとんど示さなかった (Table 4)。*Colletotrichum* 属菌胞子に対する MgO ナノ粒子 (UCM250) の殺菌作用における界面活性剤濃度依存性を調べた結果、TritonX-100 を 0.37 mM 以上の濃度で混合した MgO ナノ粒子は *C. destructivum* の胞子に対して顕著な殺菌作用を示した一方で、0.19 mM 以下で混合した MgO ナノ粒子は殺菌作用を示さなかった (Fig. 6)。同様に、*Colletotrichum* 属菌胞子に対する MgO ナノ粒子 (UCM250 および 500A) の殺菌作用における MgO ナノ粒子濃度依存性を調べた結果、100 ppm 以上の MgO ナノ粒子濃度で処理した際に顕著な殺菌作用を示し、一方で 10 ppm 以下の MgO ナノ粒子濃度では殺菌作用がほとんど確認されなかった (Fig. 7)。

2-2-2. 酵素阻害剤、ROS 除去剤およびキレート剤の *C. destructivum* 殺菌作用に及ぼす影響

界面活性剤 (TritonX-100) を含有する MgO ナノ粒子の *C. destructivum* 胞子に対する殺菌作用における ROS・NO シグナル伝達関連阻害剤およびカルシウムシグナル伝達関連阻害剤の影響を調べた。TritonX-100 (4 mM) を含有する MgO ナノ粒子 (UCM250) に O₂ 除去剤である Tiron を混合したところ、*C. destructivum* に対する殺菌作用が濃度依存的に減少した。しかしながら、ROS 除去剤 (ヒスチジン、アスコルビン酸および DMTU)、NO 除去剤 (cPTIO)、NADPH オキシダーゼ阻害剤 (DPI)、カルシウムチャネル阻害剤 (Nifedipin) およびカルシウムイオンキレート剤 (BAPTA) との混合は、*C. destructivum* に対する殺菌作用にほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 8 および Fig. 9)。

Table 4. Fungicidal effect by treatment with combination of magnesium oxide nano particles and detergent.

Spore suspension		Dead spores (%)				
Material	Detergent	<i>C. destructivum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. fulva</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>M. oryzae</i>
DW (control)	H ₂ O (control)	9.4	4.0	1.0	2.0	0
	Tween 20	7.5	5.4	0	1.0	0
	Tween 80	15.0	6.7	4.0	1.0	0
	TritonX-100	23.9	18.7	2.0	3.0	28.4
	Nonidet P-40	25.5	44.8	1.0	0	25.1
UCM250	H ₂ O (control)	6.4	1.6	1.0	1.0	0
	Tween 20	7.2	1.7	2.0	2.0	0
	Tween 80	3.3	0.8	0	3.0	2.5
	TritonX-100	82.7	41.5	1.0	5.0	30.1
	Nonidet P-40	96.8	79.5	1.0	4.0	28.7

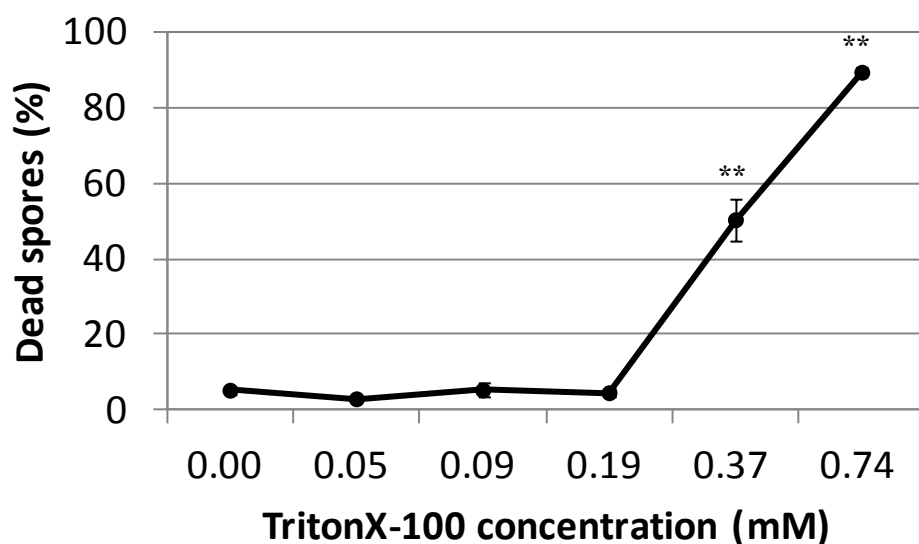


Fig. 6. Effect of Triton X-100 concentration on fungicidal activity of magnesium oxide nanoparticles. *Colletotrichum destructivum* spores were treated with combination of MgO NP and different concentration of Triton X-100. Dead spores were assessed by Evan's blue staining. Error bars represent the standard errors (n = 3). Data sets marked with asterisks are significantly different from 0 ppm, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$.

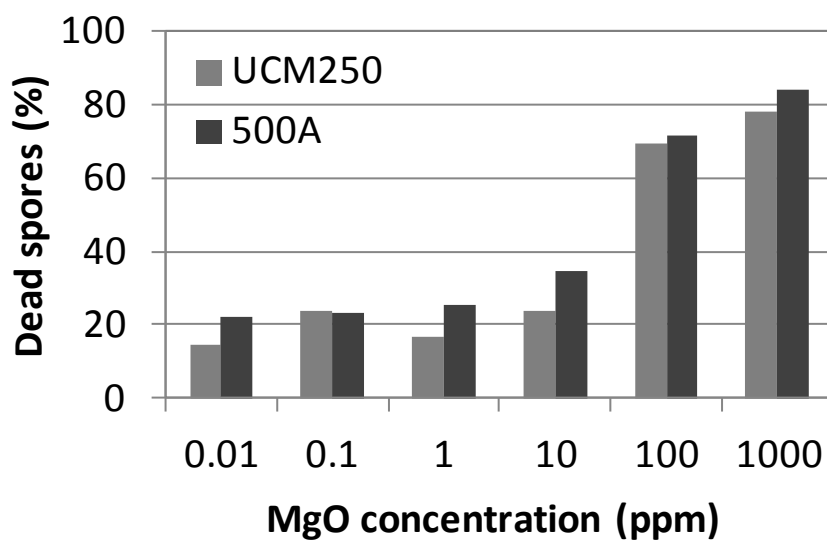


Fig. 7. Effect of magnesium oxide nanoparticles (MgONP) concentration on fungicidal activity by combinative treatment with Triton X-100. *Colletotrichum destructivum* spores were treated with combination of different concentration of MgO NP and Triton X-100. Dead spores were assessed by Evan's blue staining.

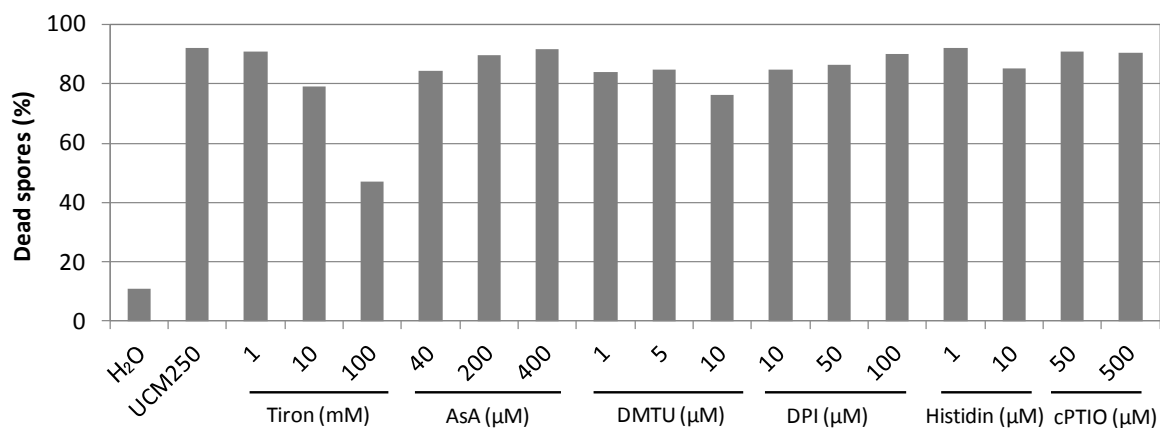


Fig. 8. Effect of Tiron on fungicidal effect of magnesium oxide nanoparticles. *Colletotrichum destructivum* spores were treated with combination of MgO NP, Triton X-100 and ROS/NO related scavenger or inhibitor. Dead spores were assessed by Evan's blue staining.

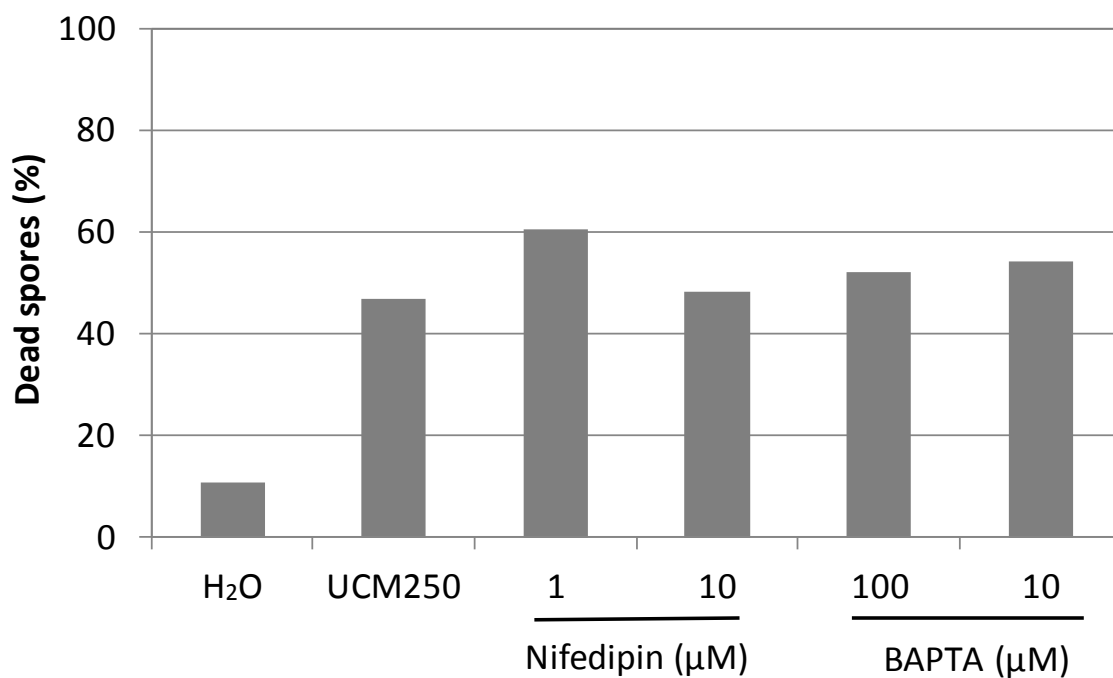


Fig. 9. No effect of calcium channel inhibitor and calcium ion chelator on fungicidal effect by magnesium oxide nanoparticles (MgONP). *Colletotrichum destructivum* spores were treated with combination of MgO NP, Triton X-100 and Nifedipin or BAPTA. Dead spores were assessed by Evan's blue staining.

3. MgO ナノ粒子処理による *A. thaliana* に対する *B. cinerea* の感染阻害作用

3-1. 局所的および全身的な *B. cinerea* 感染阻害作用

A. thaliana ロゼット葉に MgO ナノ粒子 (UCM250 あるいは 500A) を処理し、MgO ナノ粒子を滴下したロゼット葉 (Local leaf) およびその対角部位のロゼット葉 (Systemic leaf) における *B. cinerea* 感染阻害作用を調べた。接種 2 日後、コントロール植物では Local leaf および Systemic leaf において *B. cinerea* 感染時に特徴的な軟腐症状が見られたのに対し、MgO ナノ粒子処理を行った Local leaf においては UCM250 および 500A いずれの処理においても軟腐症状がほとんど見られず (Fig. 10)、接種部位における *B. cinerea* 孢子発芽が顕著に阻害されていた (Fig. 12 および Fig. 13)。また 500A を処理した Systemic leaf においても有意な病徴進展の減少がみられ、UCM250 を処理した Systemic leaf においてもコントロールとして病徴進展の減少傾向が確認された (Fig. 11)。一方、CaO あるいは ZnO を処理したシロイヌナズナでは、Local leaf および Systemic leaf とともに病徴進展の抑制効果は見られず (データ未記載)、*B. cinerea* 孢子発芽もコントロールと同程度であった (Fig. 13)。

3-2. MgO ナノ粒子処理による局所的および全身的な抵抗性関連遺伝子発現

各種酸化金属を処理したシロイヌナズナの Local leaf および Systemic leaf における抵抗性関連遺伝子発現を解析した。UCM250 あるいは 500A を処理したロゼット葉の局所的な遺伝子発現を解析したところ、MgO ナノ粒子処理 2 - 3 日後において SA 依存的な遺伝子 (*PR2* および *PR5*) の発現増加が確認された。MgO ナノ粒子処理 3 日後において JA/ET 依存的な遺伝子 (*PR3*, *PR4* および *PDF1.2*) の発現が増加しており、特に UCM250 処理によって大幅に発現増加した。また、500A を処理したロゼット葉においては MgO ナノ粒子処理 1 日以後から *PDF1.2* 遺伝子の発現が確認された (Fig. 14)。各種酸化金属 (500A、CaO および ZnO) を処理して 2 日後の Local leaf および Systemic leaf における *PDF1.2* 遺伝子発現を解析した。その結果、500A を処理したシロイヌナズナの *PDF1.2* 遺伝子発現は、Local leaf で顕著に増加しており、さらに Systemic leaf においても増加傾向にあった (Fig. 15)。一方、CaO および ZnO を処理したシロイヌナズナの *PDF1.2* 遺伝子は、Local leaf、Systemic leaf とともに変動がみられなかった (Fig. 15)。

MgO ナノ粒子 (UCM250 および 500A) 処理後に *B. cinerea* を接種し、接種 2

日後の Local leaf および Systemic leaf の抵抗性関連遺伝子発現を解析した。Local leaf において、SA 誘導性遺伝子 (*PR1*、*PR2* および *PR5*) 発現は *B. cinerea* 感染によって強く発現し、特に 500A を処理した後に *B. cinerea* を接種したロゼット葉でより強く発現する傾向がみられた (Fig. 16)。一方、JA/ET 誘導性遺伝子 (*PR3* および *PR4*) 発現も同様に *B. cinerea* 感染によって強く発現し、特に UCM250 を処理した後に *B. cinerea* を接種したロゼット葉でより強く発現する傾向がみられた (Fig. 17)。また Systemic leaf においても SA 誘導性遺伝子 (*PR1*、*PR2* および *PR5*) および JA/ET 誘導性遺伝子 (*PR3* および *PR4*) は *B. cinerea* 感染によって強く発現し (Fig. 16)、*PR5* は UCM250 および 500A を処理した後に *B. cinerea* を接種したロゼット葉においてより強く発現した (Fig. 17)。

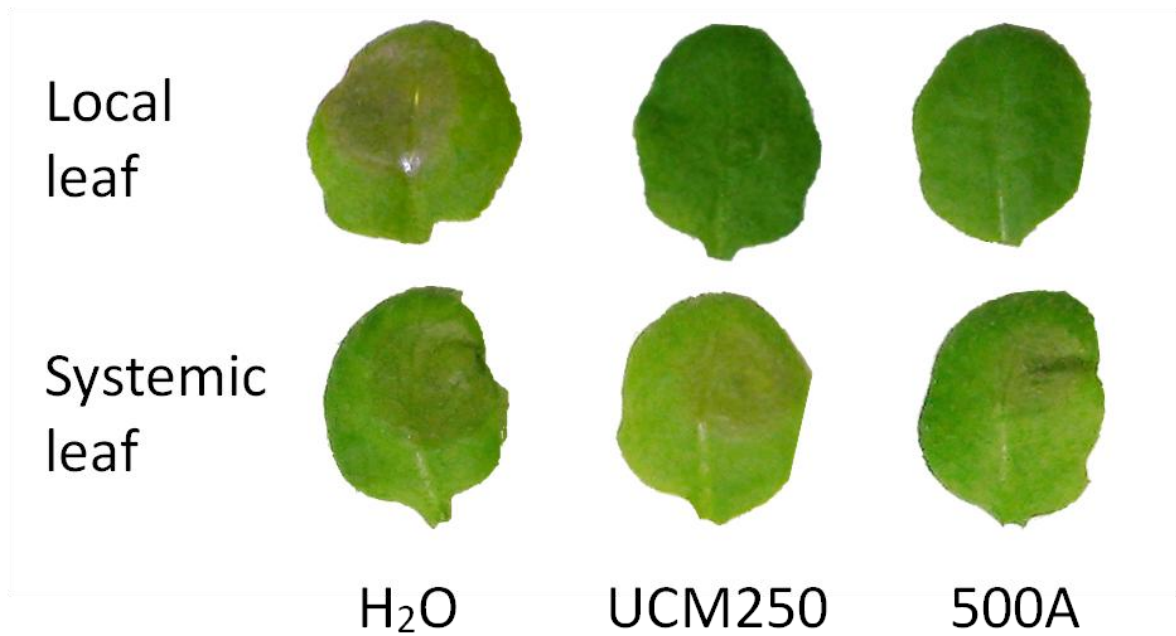


Fig. 10. The effect of magnesium oxide nanoparticles (MgONP) on disease development by *Botrytis cinerea*. *Arabidopsis* leaves were treated with MgONP for 2 days and then MgONP-treated leaves (Local leaf) and the untreated side of MgONP-treated leaves (Systemic leaf) were inoculated with *B. cinerea*.

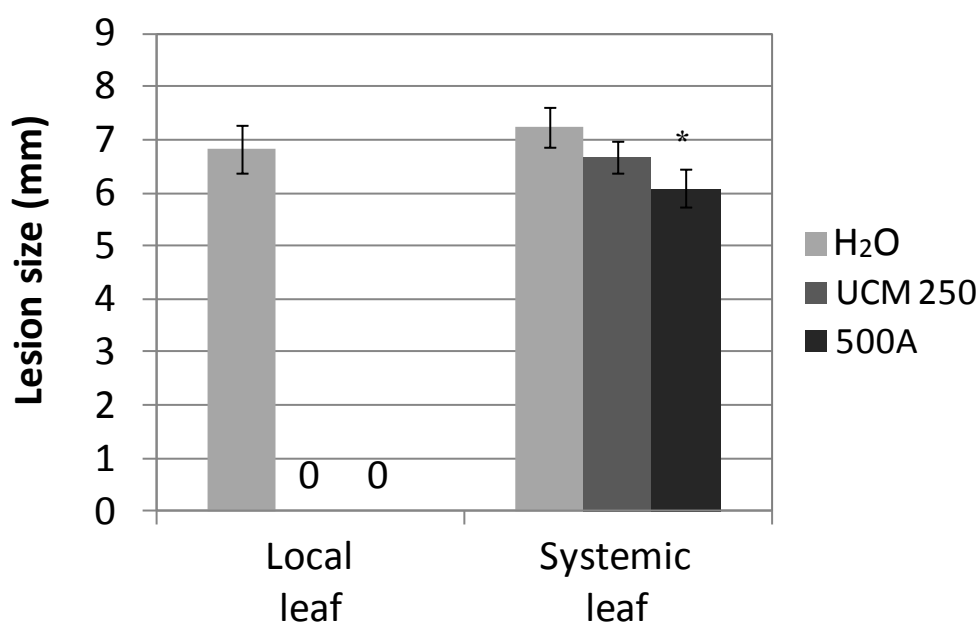


Fig. 11. The effect of magnesium oxide nanoparticles (MgONP) on spore germination of *Botrytis cinerea*. *Arabidopsis* leaves were treated with MgONP for 3 days and then MgONP-treated leaves (Local leaf) and the untreated side of MgONP-treated leaves (Systemic leaf) were inoculated with *B. cinerea*. Lesion size represents at 2 days post-inoculation. Error bars represent the standard errors (n = 6) from two independent experiments. Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; * indicates P < 0.05.

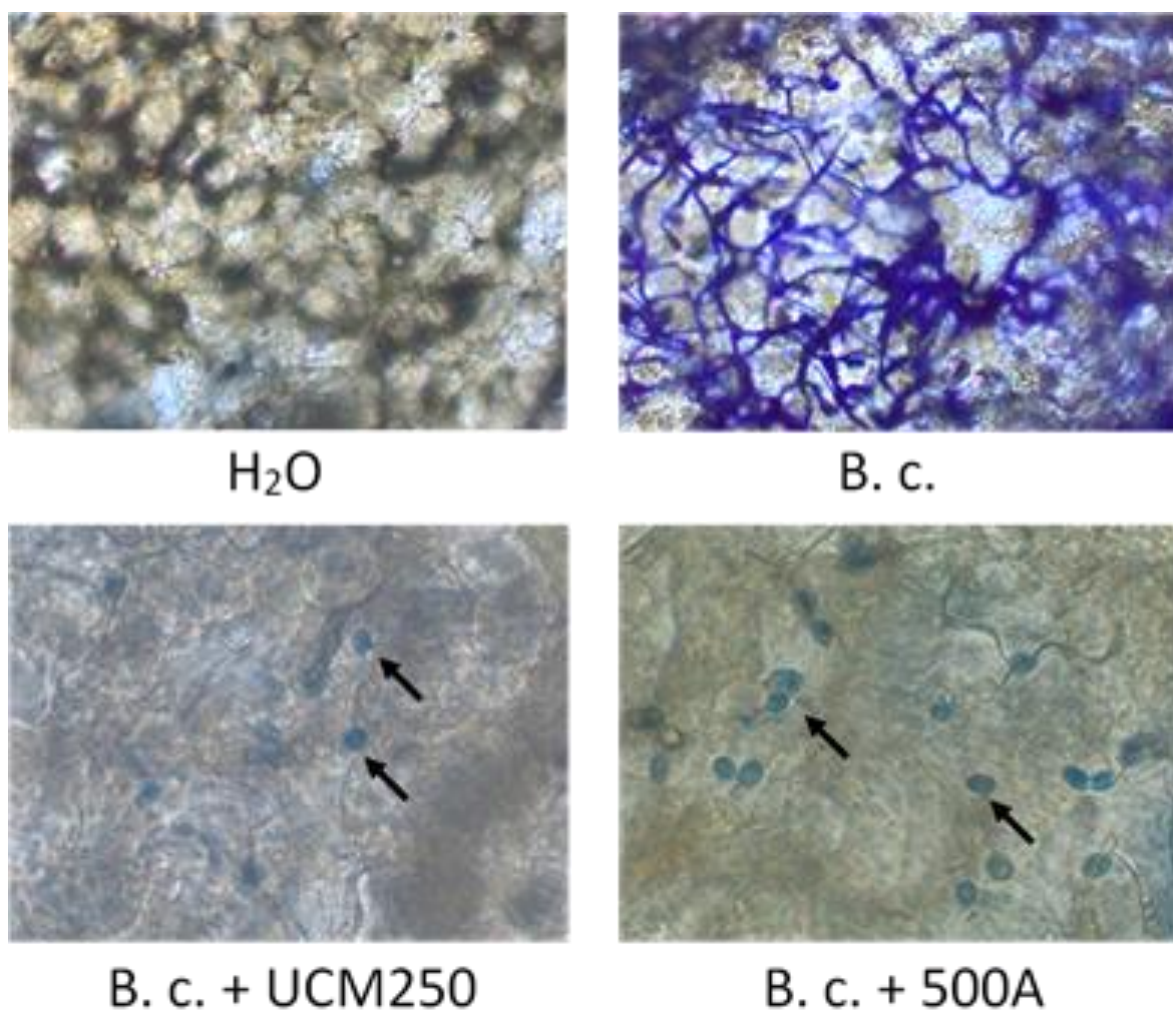


Fig. 12. Effect of MgO NP on colony formation of *Botrytis cinerea*. Leaves were treated with MgONP for 3 days and then MgONP-treated leaves (Local leaf) were inoculated with *B. cinerea*. Colony formation of *B. cinerea* on Local leaf was observed at 2 days post-inoculation.

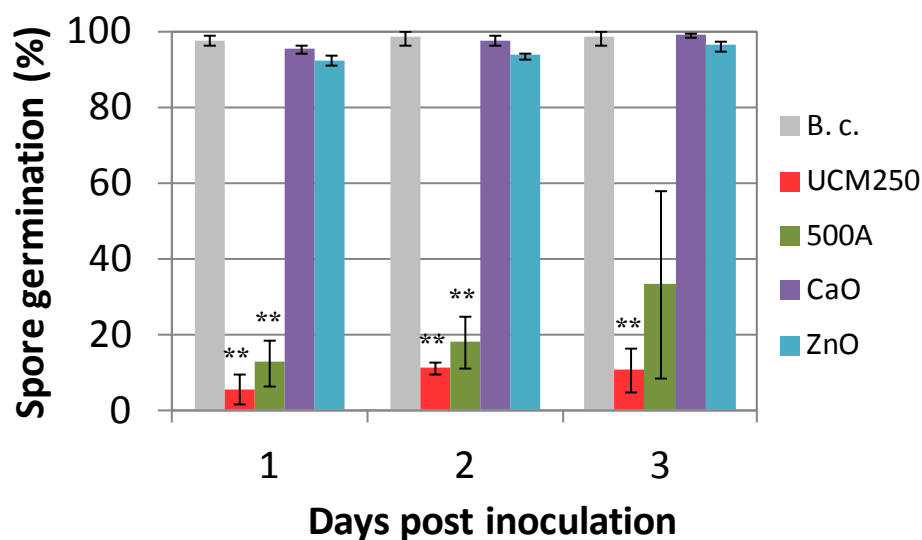


Fig. 13. Effect of metal oxide nanoparticles on spore germination of *Botrytis cinerea*. Leaves were treated with metal oxide nanoparticles for 3 days and then metal oxide nanoparticles-treated leaves (Local leaf) were inoculated with *B. cinerea*. Spore germination of *B. cinerea* on Local leaf was observed at 1, 2 and 3 days post-inoculation. Error bars represent the standard errors (n = 4) from two independent experiments. Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates P < 0.01.

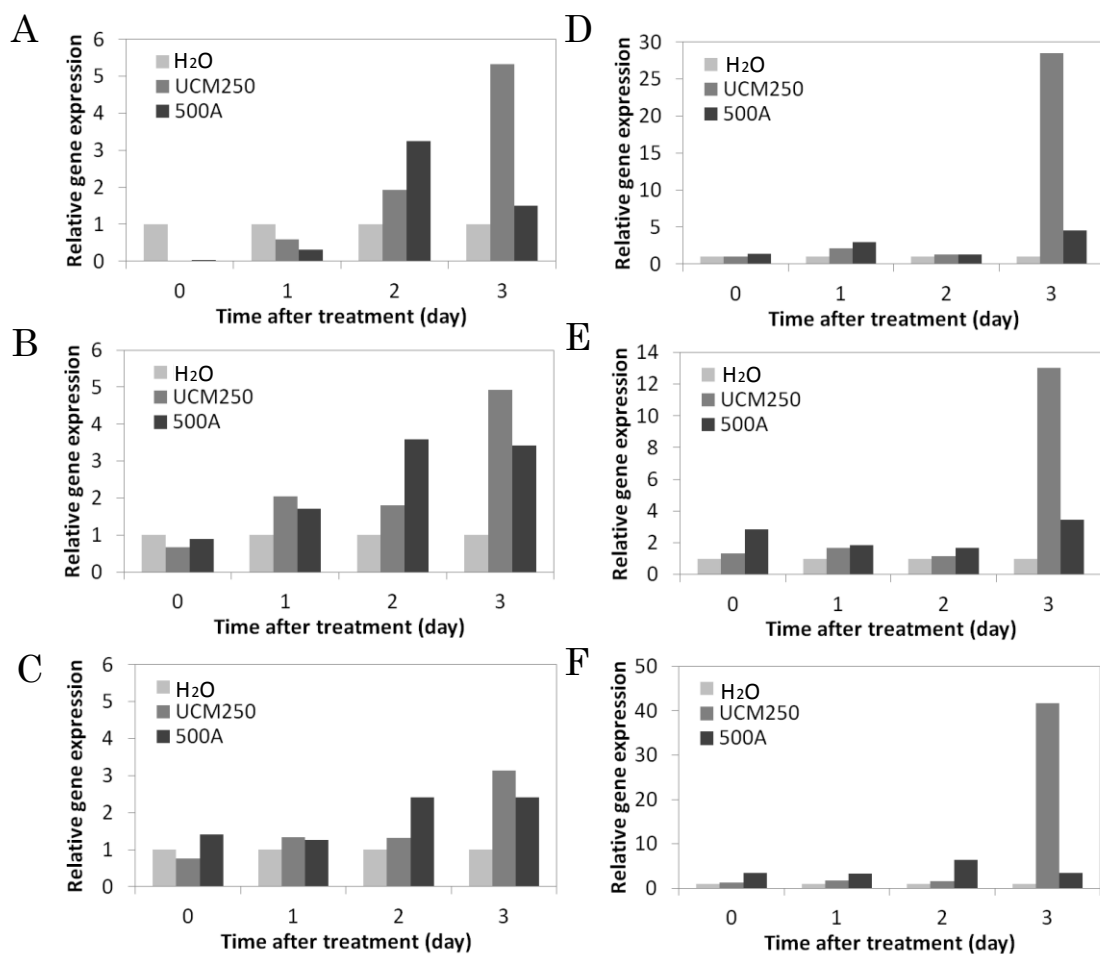


Fig. 14. Expression of defence-related genes in response to magnesium oxide nanoparticles (MgONP) treatment. Expression of *PR1* (A), *PR2* (B), *PR5* (C), *PR3* (D), *PR4* (E) and *PDF1.2* (F) was assessed in leaves of *Arabidopsis* plants at 0, 1, 2 and 3 days after treatment with MgONP or distilled water (H₂O).

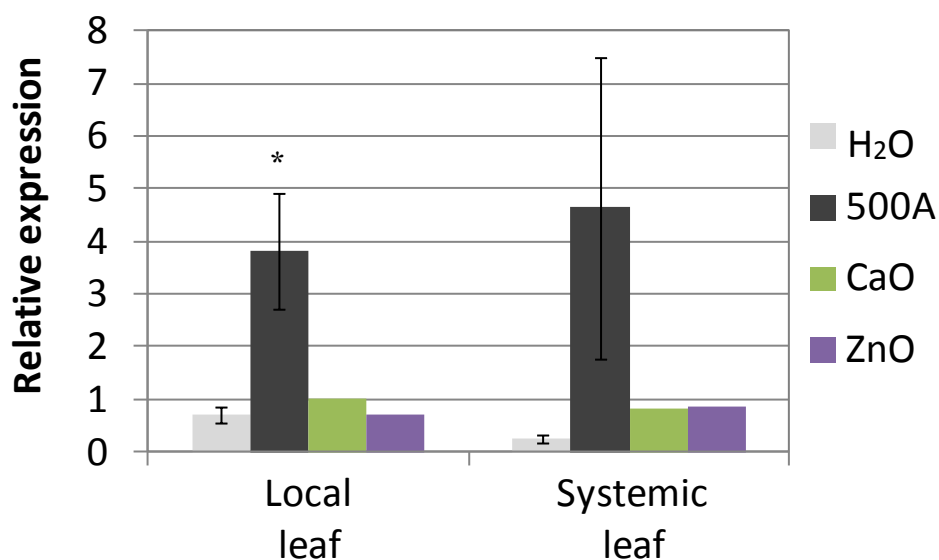


Fig. 15. Local and systemic expression of *PDF1.2* gene in response to treatment with metal oxide nanoparticles. *Arabidopsis* leaves were treated with metal oxide nanoparticles for 2 days and then expression of *PDF1.2* was assessed in MgONP-treated leaves (Local leaf) and the untreated side of MgONP-treated leaves (Systemic leaf). Error bars represent the standard errors ($n = 3$). Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's *t* test; * indicates $P < 0.05$.

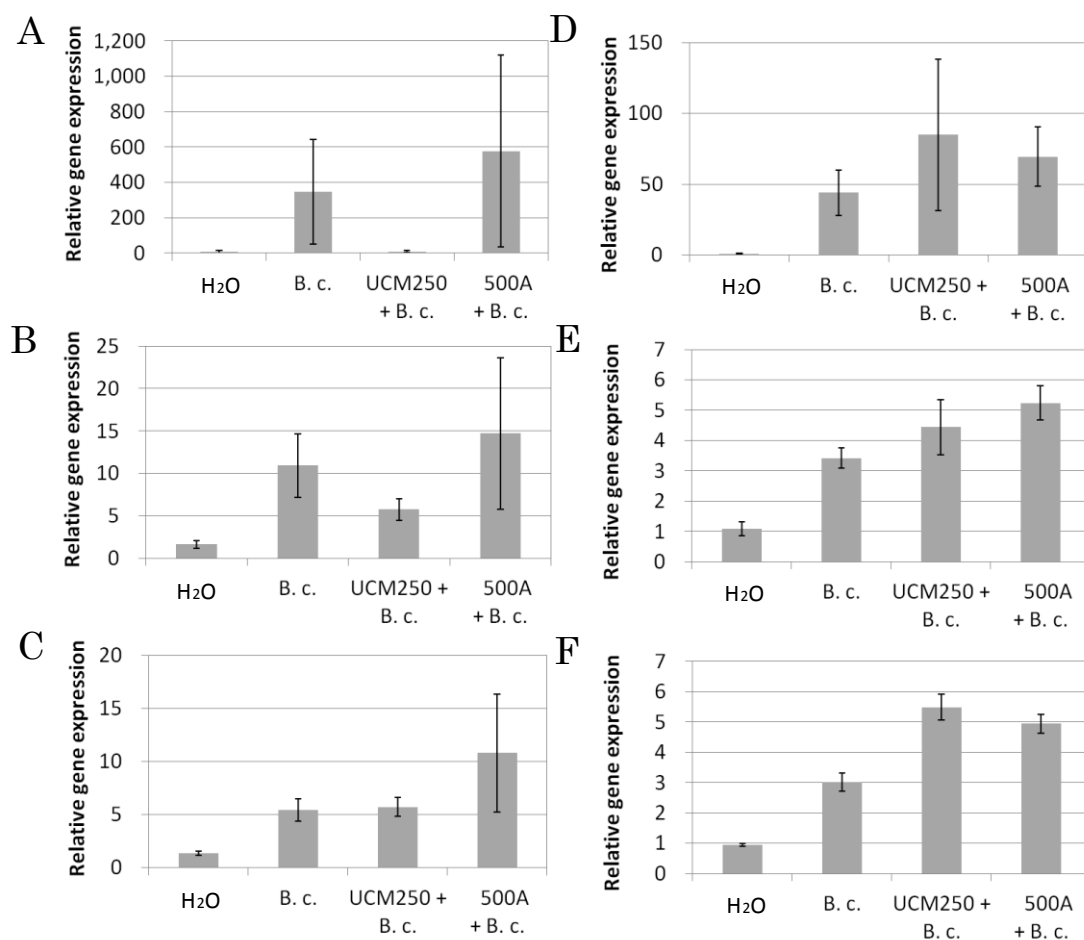


Fig. 16. Local and systemic expression profiles of salicylic acid-dependent genes in response to inoculation of *Botrytis cinerea*. *Arabidopsis* leaves were treated with MgONP for 3 days and then MgONP-treated leaves (Local leaf) and the untreated side of MgONP-treated leaves (Systemic leaf) were inoculated with *B. cinerea*. Expression of *PR1* (A and D), *PR2* (B and E) and *PR5* (C and F) was assessed in local (A, B and C) and systemic (D, E and F) leaves at 2 days after inoculation. Error bars represent the standard errors (n = 3).

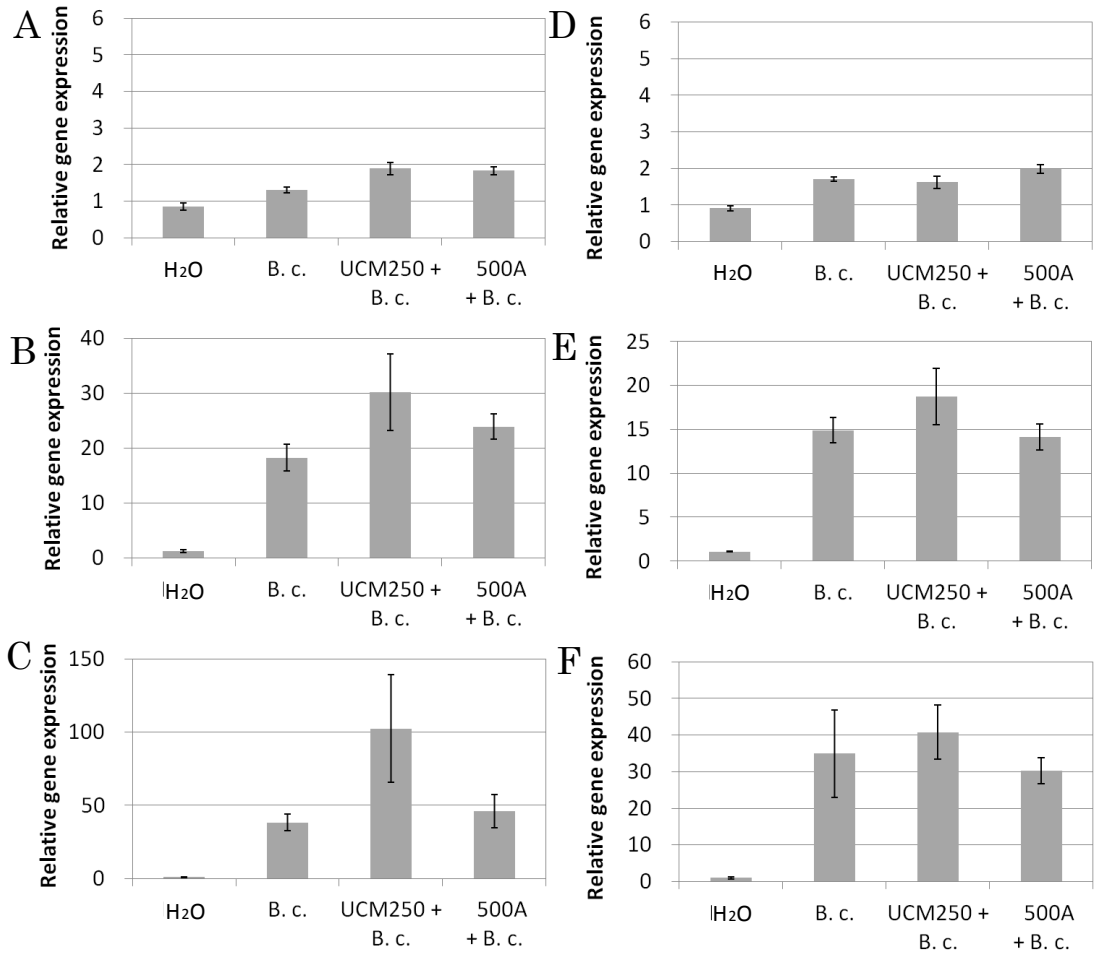


Fig. 17. Local and systemic expression profiles of jasmonic acid/ethelene-dependent genes in response to inoculation of *Botrytis cinerea*. *Arabidopsis* leaves were treated with MgONP for 3 days and then MgONP-treated leaves (Local leaf) and the untreated side of MgONP-treated leaves (Systemic leaf) were inoculated with *B. cinerea*. Expression of *PR3* (A and D), *PR4* (B and E) and *PDF1.2* (C and F) was assessed in local (A, B and C) and systemic (D, E and F) leaves at 2 days after inoculation. Error bars represent the standard errors (n = 3).

4. MgO ナノ粒子のイチゴ炭疽病発病抑制効果

MgO ナノ粒子 (UCM250 あるいは 500A) を前処理したイチゴの地上部に *Colletotrichum* 属菌の胞子を接種し、炭疽病の病徴進展を観察した。その結果、水を前処理したイチゴと比較して MgO ナノ粒子を処理したイチゴでは萎凋症状あるいは病斑の形成といった炭疽病の病徴進展が著しく抑制された (Fig. 18)。各種界面活性剤 (Tween 20、TritonX-100) あるいは水を混合した MgO ナノ粒子 (UCM250) を前処理したイチゴの地上部に *Colletotrichum* 属菌の胞子を接種した結果、界面活性剤添加の有無に関わらず MgO ナノ粒子を前処理したイチゴにおいて炭疽病の病徴進展が抑制された (Fig. 19)。

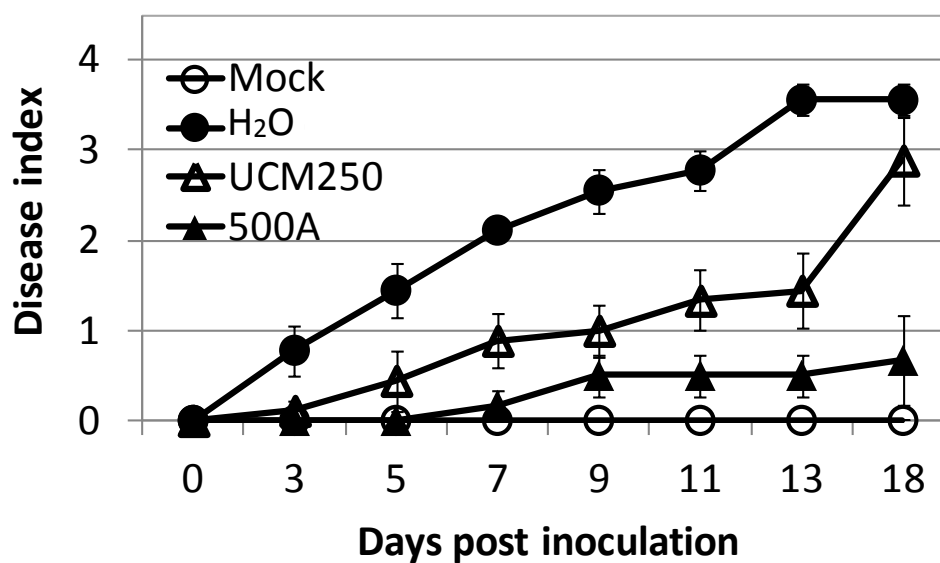


Fig. 18. The effect of magnesium oxide nanoparticles on crown rot development in strawberry plants. Error bars represent the standard error ($n = 9$) from three independent experiments.

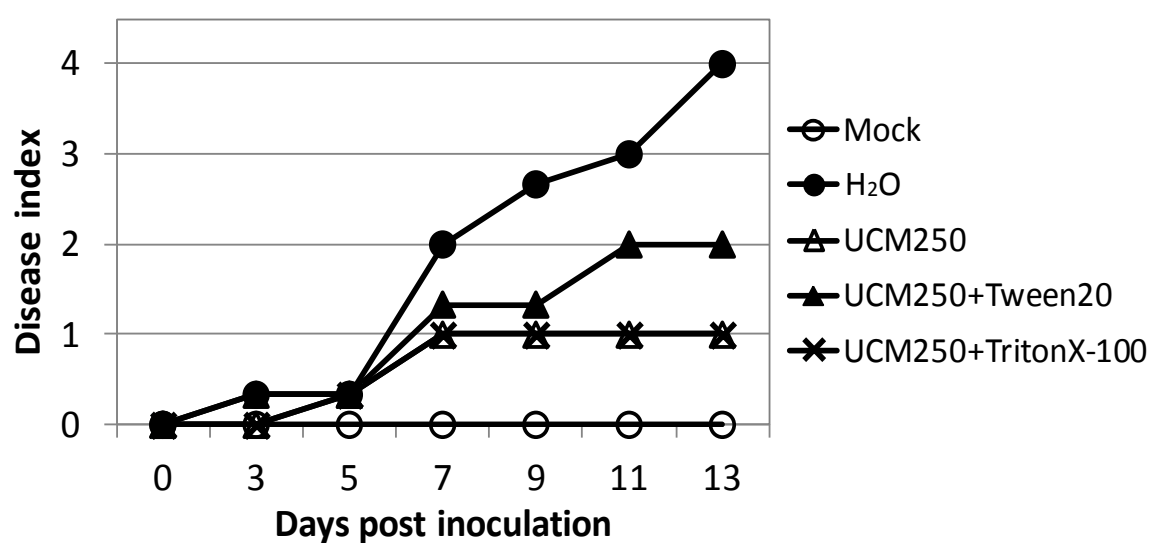


Fig. 19. No effect of detergent on suppression of crown rot development by magnesium oxide nanoparticles.

4. 考察

MgO ナノ粒子は、植物病原菌に対する強い抗菌活性を持ち、灰色かび病や炭疽病のような難防除病害に対して優れた発病抑制効果を示すことを明らかにした。

MgO ナノ粒子の植物病原糸状菌に対する抗菌性に関する報告はきわめて少ないが、Wani ら (2012) は、酸化金属である MgO および ZnO ナノ粒子が植物病原糸状菌の *A. alternata*、*F. oxysporum*、*R. stolonifer* および *M. plumbeus* に対して強い胞子発芽阻害作用を示すことを報告している。また、MgO および CaO は *Candida albicans*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Aspergillus niger* および *Rhizopus stolonifer* の生育を抑制することが知られている (Sawai and Yoshikawa, 2004)。さらに He ら (2011) は、ZnO ナノ粒子が *B. cinerea* および *Penicillium expansum* に対して強い抗菌活性を持つことを報告している。本研究では、MgO と同時に ZnO および CaO の植物病原糸状菌に対する抗菌性も調べた。その結果、ZnO は *Colletotrichum* 属菌の胞子発芽、付着器形成阻害作用を示したが、*B. cinerea* の胞子発芽抑制作用を示さず、CaO はいずれの糸状菌に対しても抗菌作用を示さなかった。酸化金属の間で抗菌作用が大きく異なった原因は本研究からは明らかでないが、製造法の差異による粒子サイズや粒子形状などの違いが関係しているのかもしれない。

MgO、CaO および ZnO 金属ナノ粒子の糸状菌に対する抗菌性メカニズムはほとんど分かっていない。走査型電子顕微鏡を用いた微小構造観察によると、ZnO ナノ粒子は *B. cinerea* 菌糸の変形および *P. expansum* 分生子柄の歪曲を誘導する (He *et al.*, 2011)。He ら (2011) は菌糸構造の変形はおそらく ZnO ナノ粒子による細胞代謝異常の結果による核酸および炭水化物の過剰な蓄積によるものであると推察している。また、MgO、CaO および ZnO ナノ粒子はその表面構造内に O_2^- や H_2O_2 を発生させ、生じた ROS が微生物に対する抗菌性に重要な役割を果たしていると考えられている (Sawai *et al.*, 1996; Sawai and Yoshikawa, 2004)。金属ナノ粒子の表面積の増加は粒子表面における反応性増加を引き起こし、その結果による ROS 発生量の増加はより強い抗菌活性をもたらす (Ohira *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2005)。実際に、*Colletotrichum* 属菌に MgO ナノ粒子を処理した場合、サイズの大きな UCM250 と比較してより粒子サイズの小さい 500A の方が強い抗菌活性を示し、また MgO ナノ粒子を処理した *B. cinerea* 胞子内および *C.*

gloeosporioides 菌糸内に ROS 蓄積が観察された。これらの結果は、MgO ナノ粒子の植物病原菌に対する抗菌性において MgO ナノ粒子表面の ROS 発生が重要な役割を果たしていることを示唆している。

本研究ではさらに、MgO ナノ粒子の *Colletotrichum* 属菌に対する殺菌作用において、疎水基にフェニルエーテル環を持つ TritonX-100 および NP-40 が重要な役割を果たすことを明らかにした。MgO 溶液による *Colletotrichum* 属菌孢子殺菌作用において、界面活性剤は疎水性の高い菌体表面の表面張力を下げ、脂質に富んだ内膜と MgO との相互作用を促進させていると考えられる。MgO ナノ粒子と界面活性剤の混合による *Colletotrichum* 属菌殺菌作用は、Tiron ($O_2^{\cdot-}$ 除去剤) によって顕著に阻害されたが、他の ROS/NO 除去剤 (AsA、DMTU、Histidin および cPTIO) および NADPH オキシダーゼ阻害剤 (DPI) は殺菌作用に影響を及ぼさなかった。Tiron は、 $O_2^{\cdot-}$ 除去剤として働くが、一方で金属イオンのキレート剤としても用いられる (Clark, 1970)。したがって、MgO ナノ粒子と界面活性剤の混合による糸状菌殺菌作用には、粒子表面から放出される $O_2^{\cdot-}$ および Mg^{2+} の量が関与している可能性がある。

本研究では、MgO ナノ粒子は *B. cinerea* および *Colletotrichum* 属菌に対して強い抗菌活性を有することを明らかにした。また、MgO ナノ粒子を処理したシロイヌナズナのロゼット葉において *B. cinerea* の孢子発芽は顕著に阻害され、さらに灰色かび病の特徴的な病徴である軟腐症状が顕著に抑制された。一方で、MgO ナノ粒子の処理はシロイヌナズナに局所的および全身的な SA、JA 依存的な遺伝子発現を誘導し、特に粒子サイズの小さな 500A 処理は全身的な *B. cinerea* 感染阻害作用を示した。MgO ナノ粒子によって全身的に発現が誘導される *PDF1.2* 遺伝子は JA によって全身的に誘導される抗菌性ペプチドであり、*B. cinerea* などのネクロトロフィックな病原菌に対する抵抗性マーカーとして知られている (Manners *et al.*, 1998; Kachroo *et al.*, 2003)。しかしながら、MgO ナノ粒子を直接処理した部位と比較して全身的な抵抗性誘導作用による発病抑制効果は低かった。このようなことから、灰色かび病の発病抑制効果は、MgO ナノ粒子による抵抗性誘導作用というよりも、直接的な殺菌作用によるものと考えられる。

MgO ナノ粒子を処理したイチゴでは、炭疽病の発病が顕著に抑制され、特に粒子サイズの小さい 500A を処理した場合に顕著な発病抑制効果が観察された。前述したように、*in vitro* ではフェニルエーテル型の界面活性剤の添加によって MgO

ナノ粒子は *Colletotrichum* 属菌の孢子に対して殺菌作用を示すようになる。しかしながら、MgO ナノ粒子の炭疽病抑制効果は、界面活性剤の添加の有無にかかわらず見られた。この原因として、イチゴの葉面における界面活性剤および孢子の状態が *in vitro* と異なることや、MgO ナノ粒子がイチゴの葉に抵抗性を誘導する可能性などが推定されるが、本研究からは明らかでない。

第2節 酸化マグネシウムナノ粒子の青枯病抑制作用

1. 序論

Ralstonia solanacearum は 200 種以上の植物に感染し、トマト、ジャガイモ、バナナ等の作物に青枯病を、またタバコには立枯病を引き起こすグラム陰性の土壌伝染性病原細菌である (Hayward, 1991)。青枯病に感染した植物の特徴としてはまず先端葉において急激なしおれが認められ、その後植物全体が萎凋し、枯死に至る。本菌は通常、宿主の根部表面に定着し、傷口および根の皮層より侵入した後、維管束柔組織や木部組織へと移動、拡散する (Hayward, 1991; Villa *et al.*, 2005)。本菌を汚染土壌から除去することは非常に困難であり、通常の化学農薬では青枯病を防除することは非常に難しい。難防除土壌病害である青枯病に対する防除法としては、耕種的防除（輪作、間作、土壌改良、土壌消毒等）や化学的防除（薬剤）、生物的防除（拮抗微生物等）および宿主抵抗性（品種抵抗性、誘導抵抗性）の利用などが挙げられる。しかしながら、いずれの手法においてもその発生を安定的に抑えることは困難な状況にあり、現在のところ抵抗性台木などを用いた抵抗性品種の利用が最も有効な防除手段となっている (Monma *et al.*, 1997; Thurston, 1976)。近年、拮抗微生物 (Sudisha *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2013) のような生物ストレスに加え、DL-3-アミノ酪酸 (Hassan and Abo-Elyousr, 2013) やシリコン (Kurabachew and Wydra, 2014) などの非生物ストレスが宿主植物の *R. solanacearum* に対する抵抗性を高め、青枯病の発病を抑制することが明らかになった。

植物への生物・非生物的ストレスは、細胞内における $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 および $OH^{\cdot-}$ 等の ROS 蓄積を引き起こす (Foyer *et al.*, 1997)。ROS はその高い反応性に起因する細胞毒性により病原菌の進展を制限するだけでなく、*PR* 遺伝子発現の誘導などの局所的・全身的な抵抗性反応において重要な役割を果たしている (Henry *et al.*, 2013)。植物ホルモンの SA、JA および ET は抵抗応答における重要なシグナル因子であり (Robert-Seilanianantz *et al.*, 2011)、SA 依存的なシグナル伝達は主にバイオトロフィックな病原菌に対して、そして JA/ET 依存的なシグナル伝達は主にネクロトロフィックな病原菌に対する抵抗性に深く関与している (Kunkel and Brooks, 2002)。植物の *R. solanacearum* に対する抵抗性機構については不明な点が多いが、SA、JA および ET を含めた植物ホルモンを介したシグナル伝達系が

R. solanacearum に対する抵抗性に関与することが示唆されている。たとえば、*R. solanacearum* を接種した青枯病抵抗性トマト品種 LS-89 のトランスクリプトーム解析では、JA/ET 生合成に関与する遺伝子発現の増加が見られた (Ishihara *et al.*, 2012)。また、Chen ら (2009) は、青枯病抵抗性トマト品種 Hawaii 7996 の SA (*NPR1*, *TGA2.2* および *TGA1a*)、JA (*COI1*) および ET (*ACO1/3*, *EIN2* および *ERF3*) シグナル伝達関連タンパク質遺伝子のサイレンシングが青枯病に対する抵抗性を顕著に低下させることを報告している。また、植物ホルモンの一種であるオーキシンは、植物細胞内で SA に拮抗して働いていることから、オーキシンシグナル伝達の抑制が青枯病抵抗性を高めている可能性もある (Kazan and Manners, 2009)。実際に、液胞膜局在性のインドール酢酸 (オーキシン) トランスポーターをコードする *wat1* (walls are thin1) が変異したシロイヌナズナは、*R. solanacearum* に対して顕著な抵抗性を示ことが明らかになっている (Ranocha *et al.*, 2010)。

トマトの *R. solanacearum* に対する抵抗性は非常に複合的であり、いくつかの量的形質座位 (quantitative trait loci; QTL) によって制御されている。例えば、抵抗性品種 Hawaii7996 は 3、6、8、10 および 11 番染色体に QTL を保持しており (Thoquet *et al.*, 1996a; Thoquet *et al.*, 1996b)、抵抗性品種 L285 (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) は 6、7 および 10 番染色体上に QTL を示す (Danesh *et al.*, 1994; Denny, 2007)。このように、トマトの *R. solanacearum* に対する抵抗性はポリジーン制御を受けていることがわかっている。一方、シロイヌナズナはモノジーン制御により *R. solanacearum* に対する抵抗性を発揮しており、抵抗性遺伝子 *RRS1-R* を保持するシロイヌナズナエコタイプ Nd-1 は *R. solanacearum* に対して ETI 誘導性の抵抗性反応を示す (Ho and Yang, 1999)。Nd-1 の *R. solanacearum* に対する抵抗性反応において植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) の関与が示唆されており、Nd-1 への *R. solanacearum* 感染時に ABA シグナル伝達に関与する遺伝子の発現が顕著に増加する (Hu *et al.*, 2008)。また、シロイヌナズナは *R. solanacearum* に対してモノジーンによる抵抗性を有するだけでなく、少なくとも 3 つの QTL を介したポリジーンによる抵抗性誘導機構を有している (Godiard *et al.*, 2003)。しかしこれらポリジーンによる抵抗性機構は非常に複雑な制御を受けており、その分子機構は明らかになっていない。

R. solanacearum の感染は植物の細胞内シグナル伝達の変化に加えて、抵抗性に

関与する様々な物理的なバリアーの形成を引き起こす。例えば抵抗性トマト品種 Caraïbo への *R. solanacearum* 感染は、トマト胚軸組織にバルーン様の構造を持つチロース形成を誘導し、それらは特に細菌がコロニー形成を行う木部導管や木部付随柔組織に蓄積する (Grimault *et al.*, 1994)。

近年、病原菌感染に対する植物の自然免疫を解明することを目的とした基礎研究だけでなく、外部からの非生物的な刺激を加えることによって誘導される抵抗性を利用して病害を制御することを目的とした実用化研究も活発化している。MgO ナノ粒子は一般的に医療用薬剤、廃棄物浄化、毒性ガスの除去、塗料および半導体などの用途に用いられている (Bhargava *et al.*, 1998; Hossain *et al.*, 2014; Liang and Gay, 1986; Tsuji *et al.*, 1994; Yang and Lieber, 1996)。本研究で明らかにしたように、MgO ナノ粒子は非生物ストレスとして植物に病害抵抗性を誘導する。MgO ナノ粒子は、多くのエッジ/コーナー構造と反応性の高い表面構造を特徴とした結晶構造粒子であり、その微小なサイズに起因した広い表面積を持っている (Klabunde *et al.*, 1996; Stoimenov *et al.*, 2002)。これらの特徴的な構造により、MgO ナノ粒子は粒子表面に ROS を発生させる (Baird and Lunsford 1972; Sawai *et al.* 1996)。MgO ナノ粒子は細菌に対して強い抗菌性を有しており、これらの作用は粒子からの $O_2^{\cdot -}$ 発生やバクテリア表面の負の帯電と MgO ナノ粒子の正の帯電に起因する互いの吸着によってもたらされる (Huang *et al.*, 2005; Jin and He, 2011; Koper *et al.*, 2002)。細菌と MgO ナノ粒子の接触頻度はその抗細菌活性に深く関わっている (Sawai *et al.*, 2000)。酸化チタン、銅および銀といった他の無機殺菌剤と比較して、MgO ナノ粒子は生物への安全性が高く、環境への負荷が少ない無機物であり、さらに非常に製造コストが低いという点で農業への応用に適した化合物である。

MgO ナノ粒子は強い抗細菌活性を有するにもかかわらず、トマト青枯病のような細菌病に対する有効性についてはこれまで報告例がない。加えて、植物への誘導抵抗性といった観点からの MgO ナノ粒子の影響については明らかとなっていない。MgO ナノ粒子が発生する ROS は植物の病原菌に対する初期抵抗応答として知られており、MgO ナノ粒子の処理は植物に病原菌認識時における抵抗性反応と類似した作用を引き起こすと考えられる。そこで本研究では、MgO ナノ粒子による青枯病の発病抑制効果を明らかにすることを目的として実験を行った。また、モデル植物であるトマトおよびシロイヌナズナを用いて *R. solanacearum* に対する誘導

抵抗性の分子機構を解析するとともに、トマトへの誘導抵抗性を組織学的な手法を用いて調べた。

2. 材料および方法

1. 酸化金属材料

宇部マテリアルズ製の酸化マグネシウム UCM95S、UCM250、500A、UK400、UK650、UGK550、UGK700、UGK800、UGK900 および UGK1000 を用いた。各 MgO の製造は以下のように行った。すなわち、UC95S は $\text{Mg}(\text{OH})_2$ をロータリーキルンにて滞留時間 10 数分間、 $1,000^\circ\text{C}$ の焼成で得られた。UCM250 は $\text{Mg}(\text{OH})_2$ を入口 550°C ～出口 700°C で、外熱式ロータリーキルンに数分間滞留焼成し、焼成後空冷することで得られた。500A は熔融蒸発した金属 Mg に気体酸素を噴射（気相法）することで得られた。UK および UKG で記した MgO は $\text{Mg}(\text{OH})_2$ を電気炉で、1 時間焼成（急加熱，設定温度）後、デシケーター内で放冷することで得られた。数字は焼成温度を示す。また市販の酸化金属材料として、酸化亜鉛（ZnO）（ $\sim 5\ \mu\text{m}$, 265-00971; $0.02\ \mu\text{m}$, ; Wako）および酸化カルシウム（CaO）（036-13572 ; Wako）を用いた。以下に示す全ての実験では、酸化金属懸濁液は超音波処理を数分間行った後、試験に供試した。

2. 供試植物

供試植物としてトマト (*Solanum lycopersicum* L.) およびシロイヌナズナ (エコタイプ: col-0) を用い、トマト品種桃太郎（タキイ種苗）および Moneymaker を使用した。また、Moneymaker にサリチル酸分解酵素をコードするサリチル酸ヒドロキシラーゼを導入した NahG (Branding *et al.* 2000) を用いた。シロイヌナズナの変異体として、サリチル酸合成経路に欠損のある *sid2-2* (Wildermuth *et al.*, 2001)、エチレン非応答性の *etr1-1* (Bleecker *et al.*, 1988) およびジャスモン酸合成経路に欠損のある *fad3-2* (Lemieux *et al.*, 1990) および *fad7-1,8* (McConn *et al.*, 1994) を用いた。トマトおよびシロイヌナズナの生育条件は上記（第 1 節）と同様の条件で行った。

3. トマト培養細胞株

トマト培養細胞は、理化学研究所バイオリソースセンターから分与された GCR26 株を用いた。培養細胞株は MS 無機塩類 $4.6\ \text{g/l}$ 、スクロース $30\ \text{g/l}$ 、MS-inositol (myo-イノシトール $400\ \text{mg}/10\ \text{ml}$) $2.5\ \text{ml/l}$ 、2,4-ジクロロフェノキシ

酢酸 (2 mg/10 ml)、ナフタレン酢酸 (1 mg/10 ml)、MS-VT (チアミン塩酸塩 1 mg/10 ml、ピリドキシン塩酸塩 5 mg/10 ml、ニコチン酸 5 mg/10 ml、グリシン 20 mg/10 ml) 1 ml/l、trans-ゼアチン (1 mg/10 ml) 5 ml の生育培地で 25℃、旋回培養法 (120 rpm) により培養し、同培地で 1 週間ごとに継代した (Ishibashi *et al.*, 2007)。

4. 供試菌

山口県農林総合技術センターの鍛冶原氏から分与された *R. solanacearum* M 菌株は、20% グリセロールにより - 80℃ で保存した。保存菌株を Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) 寒天培地 (ペプトン 10 g/l、カザミノ酸 1 g/l、グルコース 5 g/l、寒天 18 g/l、テトラゾリウムクロライド 50 mg/l) に画線後、30℃ で 2 日間培養した。得られたシングルコロニーを Casamino acid-Peptone-Glucose (CPG) 培地 (TTC 培地からテトラゾリウムクロライドおよび寒天を除いたもの) に接種し、120 rpm、30℃ で 2 日間培養した。培養後の培地を回収し、10,000×g で 2 回洗浄した。細菌密度は、光度計 (miniphoto518R;TAITEC) を用いて 660 nm の OD 値 0.3 (約 1×10^8 cfu/ml) に調整し、以下の実験に用いた。また、この際の細菌密度は CPG 寒天培地を用いた希釈法によって計測した。

5. MgO の *R. solanacearum* に対する抗菌性検定

CPG 培地内の細菌密度を OD 値 0.3 (約 1×10^8 cfu/ml) に調製した *R. solanacearum* の菌懸濁液に MgO ナノ粒子 (500A) を 0 - 500 ppm の濃度で混合した。培地を 30℃、120 rpm の暗黒下 6 時間インキュベートした後、TTC 培地を用いた平板希釈法により細菌の cfu を計測した。

6. MgO の青枯病発病抑制効果

6-1. トマト青枯病発病抑制効果

6-1-1. 接種直後の MgO 処理による青枯病抑制効果

生育したトマト (桃太郎) の根を水道水で洗浄後、根の長さが 5 cm 程度となるように切断した後、*R. solanacearum* の菌体懸濁液に数分間浸漬した。滅菌済みのバーミキュライトにトマト個体を植え付けた後、0.1%あるいは 1%の UCM250 (w/v、蒸留水に懸濁) 懸濁液を 50 ml 灌注した。接種したトマト個体は 25℃、12

時間の明期条件下（光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）に移し、発病の進展を観察した。以下の基準で各トマト個体の発病度を算出した。0：無発病、1：1~25%未満の本葉が萎凋、2：25~50%未満の本葉が萎凋、3：50~75%未満の本葉が萎凋 4：75~100%の本葉が萎凋。

6-1-2. MgO の青枯病抵抗性誘導効果

生育したトマト個体（桃太郎）に各濃度の酸化金属（蒸留水に懸濁）懸濁液を 50 ml 灌注した。コントロールとして、NaOH で pH 11 に調整した蒸留水、pH 未調整の蒸留水および上記の方法で UCM250 粒子を除いた粒子除去液を用いた。25℃、12 時間の明期条件（光量子束密度 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で 7 日間生育させたトマトの根を水道水で洗浄することにより酸化金属粒子を除いた。根の洗浄後、上記と同様の方法で接種および発病度の判定を行った。

6-2. *A. thaliana* に対する *R. solanacearum* 抵抗性誘導作用

6-2-1. 酸化金属処理による *R. solanacearum* に対する抵抗性誘導作用

生育させたシロイヌナズナ個体に 0.1% (w/v) の酸化金属（蒸留水に懸濁）懸濁液または 0.01 - 0.1% (w/v) の UCM250 または 500A（蒸留水に懸濁）懸濁液を 10 ml 灌注処理した。コントロールとして、NaOH で pH 11 に調整した蒸留水または pH 未調整の蒸留水を用いた。25℃、12 時間の明期条件下（光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で 3 日間生育させた後、根を水道水で洗浄することにより酸化金属粒子を除いた。根を長さが 3 cm 程度となるように切断した後、*R. solanacearum* の菌体懸濁液に数分間浸漬した。接種したシロイヌナズナ個体を滅菌済みのバーミキュライトに植え付け、25℃、12 時間の明期条件下（光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で発病の進展を観察した。以下の基準で各シロイヌナズナ個体の発病度を算出した。0：無発病、1：1~25%未満のロゼット葉が萎凋、2：25~50%未満のロゼット葉が萎凋、3：50~75%未満のロゼット葉が萎凋 4：75~100%のロゼット葉が萎凋。

7. 抵抗性関連遺伝子発現解析

7-1. トマトの抵抗性関連遺伝子発現パターン解析

生育させたトマト個体（桃太郎）に 0.7% (w/v) の UCM250（蒸留水に懸濁）懸濁液を 50 ml 灌注処理し、25℃、12 時間の明期条件下（光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で 3 日間生育させた後、根を水道水で洗浄することにより酸化金属粒子を除いた。根を長さが 3 cm 程度となるように切断した後、*R. solanacearum* の菌体懸濁液に数分間浸漬した。接種したトマト個体を滅菌済みのバーミキュライトに植え付け、25℃、12 時間の明期条件下（光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）で発病の進展を観察した。以下の基準で各トマト個体の発病度を算出した。0：無発病、1：1~25%未満の本葉が萎凋、2：25~50%未満の本葉が萎凋、3：50~75%未満の本葉が萎凋 4：75~100%の本葉が萎凋。

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 生育させた。MgO 処理 12、24、72 および 120 時間後にトマトの根および胚軸部を回収し、液体窒素で凍結させた後 - 80°C で保存した。RNA の抽出およびリアルタイム PCR は前記 (4-2) と同様の方法で行った。抵抗性関連遺伝子特異的プライマーの配列を Table 5 に示す。

7-2. *A. thaliana* の抵抗性関連遺伝子発現パターン解析

生育させたシロイヌナズナ個体 (col-0) に 0.1% (w/v) の 500A (蒸留水に懸濁) 懸濁液を 10 ml 灌注処理し、25°C、12 時間の明期条件下 (光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 生育させた。MgO 処理 12、24、48 および 72 時間後にシロイヌナズナの根および地上部を回収し、液体窒素で凍結させた後 - 80°C で保存した。また、MgO を前処理したことによる、*R. solanacearum* 感染後の抵抗性関連遺伝子発現の変動を解析するため、前記の方法で 500A を前処理したシロイヌナズナに *R. solanacearum* の接種を行い、接種 24 および 120 時間後の地上部を回収、保存した。RNA の抽出およびリアルタイム PCR は前記と同様の方法で行った。抵抗性関連遺伝子特異的プライマーの配列を Table 6 に示す。

Table 5. Oligonucleotide primers for analyzing the defense-related gene expression in tomato.

Taget gene	Primer pair	Accession No.	Sequence (5'-3')
PR1	SlPR1-F	M69247	TGTTGTTTCCCTTTGATGTTGCT
	SlPR1-R		AACCTAAGCCACGATACCATGAA
Chi3	SlCHI3-F	Z15141	ACCCGTTGCACTGTCTTGTCT
	SlCHI3-R		AATGGAACCGGCATTTTGTG
GluA	SlGLUA-F	M80604	TTTTGGCCATGCTGATGATAAT
	SlGLUA-R		TGCATCGTTTAGCCCTTGTTG
LoxA	SlLoxA-F	U09026	AAACAGAACAGGCCCCGTTA
	SlLoxA-R		GCCTGTAAGTCCACCTTCACTTG
Pin2	SlPin2-F	K03291	CGTTCACAAGGAAAATCGTTAA ^a
	SlPin2-R		ATTTGCCTTGGGTTCATCAC ^a
Osm	SlLoxA-F	M21346	TGTACCACGTTTGGAGGACA ^b
	SlLoxA-R		ACCAGGGCAAGTAAATGTGC ^b
Actin	SlAct-F	FJ532351	TGTCCCTATCTACGAGGGTTATGC
	SlAct-R		CAGTTAAATCACGACCAGCAAGA

a: Fragkostefanakis *et al.*, 2013. b: Milling *et al.*, 2011.

Table 6. Oligonucleotide primers for analyzing the defense-related and phytohormone signaling-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*.

Taget gene	Primer pair	Accession No.	Sequence (5'-3')
PR1	AtPR1-F	M90508	CTCGGAGCTACGCAGAACAA
	AtPR1-R		TTCTCGCTAACCCACATGTTCA
PR2	AtPR2-F	NM115586	AGTCGGGACGAGTGTGAAAA
	AtPR2-R		GCCTTCTCGGTGATCCATTC
PR3	AtPR3-F	NM112085	CGCCACGAGGAAGAAGGA
	AtPR3-R		TATGGTCCGTCTGGTGCTGTAG
PR4	AtPR4-F	NM111344	ACAACAATGCGGTCGTCAAG
	AtPR4-R		TAGGCCCACTTCCCCAACA
PR5	AtPR5-F	NM106161	GTGTTTCATCACAAGCGGCATT
	AtPR5-R		CCGAGCTTGGGTCCTTGAC
PDF1.2	AtPDF1.2-F	NM123809	CACCCTTATCTTCGCTGCTCTT
	AtPDF1.2-R		CTTCTGTGCTTCCACCATTGC
Thi2.1	AtThi2.1-F	L41244	CTCAGCTGATGCTACCAATGAGC
	AtThi2.1-R		GCTCCATTACAAATTTCACTTGC
DHS1	AtDHS1-F	NM120162	AATCCGTTGCGTCTTCTTCGT
	AtDHS1-R		AGCACAGACTCAAGCTCATTGG
ASA1	AtASA1-F	NM120655	ACAATCGTTTTTCCGACAGCAT
	AtASA1-R		CGTCTTGCGGGTCACTATCA
ATR1	AtATR1-F	NM125482	GCTTGGCGGGACGAACT
	AtATR1-R		GGTTTGTGAGTGATTGCATCGA
AKN2	AtAKN2-F	NM120157	TTCCCTCACCGCTGATTTTC
	AtAKN2-R		CTGTGCATCTGCATATCGAA
ABF1	AtABF1-F	NM103859	TCAACAACCTTAGGCGGCGATAC ^a
	AtABF1-R		GCAACCGAAGATGTAGTAGTCA ^a
ERD10	AtERD10-F	NM_180616	TCTCTGAACCAGAGTCGTTT ^a
	AtERD10-R		CTTCTTCTCACCGTCTTCAC ^a
CPK4	AtCPK4-F	NM117025	TCTGTGACACTCCTCTTGATGAC
	AtCPK4-R		GCTCATCTACAAAAGTGGAACG
CPK2	AtCPK2-F	NM103271	CGAAGAAGAACCAACAAAAACC
	AtCPK2-R		GCCATACATCTTCGTAATCCTCG
Actin	AtAct-F	NM112764	TCCTCCGTCTTGACCTTGCT
	AtAct-R		ATTTCCTGCTCTGCTGTTGT

a: Zhu *et al.*, 2007.

8. MgO の青枯病抵抗性誘導効果における SA の関与

8-1. トマト青枯病抵抗性誘導効果における SA の関与

生育させたトマト個体 (Moneymaker および NahG) を 0.7% (w/v) の UCM250 (蒸留水に懸濁) 懸濁液 50 ml で灌注処理し、前記と同様の条件下でさらに 7 日間生育させた。接種および発病度の判定もまた、前記と同様の方法で行った。

8-2. *A. thaliana* に対する *R. solanacearum* 抵抗性誘導作用における SA の関与

生育後のシロイヌナズナ野生型 col-1 および変異シロイヌナズナ個体に 0.1% (w/v) の UCM250 (蒸留水に懸濁) 懸濁液 10 ml を灌注処理し、上記と同様の条件下で 3 日間生育させた後、*R. solanacearum* を接種した。接種および発病度の判定もまた、前記と同様の方法で行った。

9. MgO ナノ粒子に対する植物のストレス応答

9-1. トマト培養細胞内 ROS 蓄積の検出

9-1-1. 各種酸化金属を処理した培養細胞内 ROS 蓄積の検定

トマト培養細胞内の ROS 蓄積は CM-H2DCFDA (Molecular probes) を用いて検出した。継代 5 日後の培養細胞をミラクロスで濾過後、3000×g で遠心し、 1×10^6 個/ml 程度の濃度に調製した。各種酸化金属 (最終濃度 100 ppm、滅菌水に溶解) 懸濁液を培養細胞懸濁液に混合し、24 穴ウェルプレートに 1 ml ずつ分注した後、旋回培養 (120 rpm) および 25°C の暗黒下で 30 分間インキュベートした。培養細胞懸濁液を PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄した後、CM-H2DCFDA (12.5 μ M) を加え、20 分間、暗黒下でインキュベートした。さらに PBS (pH 7.2) で 2 回洗浄した後、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; BIORIVO, Keyence) を用いて蛍光発生を観察した。ROS 依存的な緑色蛍光は GFP-BP (励起波長 470/40、吸収波長 535/50) BZ フィルタを用いて検出した。

9-1-2. 500A 処理による培養細胞内 ROS 蓄積の経時的変化

トマト培養細胞は前記のように調製した。500A (最終濃度 100 ppm、滅菌水に溶解) 懸濁液を培養細胞懸濁液に混合し、24 穴ウェルプレートに 1 ml ずつ分注した後、旋回培養 (120 rpm) および 25°C の暗黒下でインキュベートした。各タイムピリオドで培養細胞懸濁液を回収し、PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄した。そして洗浄

後の培養細胞に CM-H2DCFDA (12.5 μ M) を加えて 20 分間、暗黒下でインキュベートした。さらに PBS (pH 7.2) で 2 回洗浄後、ROS 依存的な緑色蛍光を前記の方法で検出した。

9 - 1-3. NADPH オキシダーゼ阻害剤および Ca イオンシグナル伝達阻害剤の ROS 発生に及ぼす影響

トマト培養細胞は前記のように調製した。各濃度に調製した DPI、Tiron (最終濃度 10 mM)、Nifedipin (最終濃度 100 μ M)、TMB-8 (最終濃度 100 μ M)、BAPTA (最終濃度 1000 μ M)、EDTA (最終濃度 1000 μ M) および EGTA (最終濃度 1000 μ M) を培養細胞懸濁液に混合し、旋回培養 (120 rpm) および 25°C の暗黒下で 20 分間インキュベートした。培養後、500A (最終濃度 100 ppm、滅菌水に溶解) 懸濁液を培養細胞懸濁液に混合し、24 穴ウェルプレートに 1 ml ずつ分注した後、旋回培養 (120 rpm) および 25°C の暗黒下で 30 分間インキュベートした。PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄を行った後、CM-H2DCFDA (12.5 μ M) を加え、暗黒下で 20 分間インキュベートした。PBS (pH 7.2) で 2 回洗浄後、ROS 依存的な緑色蛍光を前記の方法で検出した。

9 - 2. トマト培養細胞内 NO 蓄積の検出

前記のように調製したトマト培養細胞の NO 蓄積は DAF-2DA (Daiichi Pure Chemicals) を用いて検出した。500A (最終濃度 100 ppm、滅菌水に溶解) 懸濁液を培養細胞懸濁液に混合し、24 穴ウェルプレートに 1 ml ずつ分注した後、旋回培養 (120 rpm) および 25°C の暗黒下で 2 時間インキュベートした。培養細胞懸濁液を PBS (pH 7.2) で 2 回洗浄した後、DAF-2DA (12.5 μ M) を加えて 30 分間、暗黒下でインキュベートした。さらに PBS (pH 7.2) で 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; BIORREVO, Keyence) を用いて蛍光発生を観察した。NO 依存的な緑色蛍光は GFP-BP (励起波長 470/40、吸収波長 535/50) BZ フィルタを用いて検出した。

9 - 3. トマト培養細胞の細胞死検出

トマト培養細胞は上記のように調製した。死細胞の蓄積はプロピジウムイオダイド (PI) (Sigma) を用いて検出した。500A (最終濃度 100 ppm、滅菌水に溶解) 懸

濁液を培養細胞懸濁液に混合し、24 穴ウェルプレートに 1 ml ずつ分注した後、旋回培養 (120 rpm) および 25°C の暗黒下で 6 時間インキュベートした。培養細胞懸濁液を回収後、PBS (pH 7.2) で 3 回洗浄を行い、PI (5 µg/ml) または 1 µg/ml の 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (WAKO) を加えて 20 分間、暗黒下でインキュベートした。さらに PBS (pH 7.2) で 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; BIORREVO, Keyence) を用いて蛍光発生を観察した。PI 染色由来の赤色蛍光は TRITC BZ フィルタ (励起波長 540/25、吸収波長 605/55)、DAPI 染色由来の青色蛍光は DAPI-BP (励起波長 360/40、吸収波長 460/50) BZ フィルタを用いて検出した。

9 - 4. フォルマザン比色法による $O_2^{\cdot -}$ 生成の検出

9 - 4 - 1. フォルマザンスタンダード溶液の調製

Grellet-Bournonville and Díaz-Ricci (2011) の方法を一部改変して精製フォルマザンを得た。すなわち、27 µM リボフラビン、17 mM メチオニンおよび 1 mg/ml のニトロブルーテトラゾリウムクロライド (NBT) を含む 50 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.8) を調製し、室温で 1 晩静置することによってフォルマザンを生成させた。生成したフォルマザンを 12,000×g で 10 分間遠心後、蒸留水で 5 回、99% (v/v) EtOH で 5 回洗浄した。ペレットを遠心減圧乾燥器で乾燥し、フォルマザンの重量を測定した。精製フォルマザンを DMSO、2M KOH (1.6 : 1) 溶液で溶解してスタンダード溶液を調製した。

9 - 4 - 2. ポリフェノールと MgO ナノ粒子との反応によって発生する $O_2^{\cdot -}$ の検出

各種酸化金属懸濁液 (100 µl)、各種ポリフェノール溶液 (20 µg/ml、100 µl)、および NBT 溶液 (100 µl) を混合した。コントロールとして MgO を含まない蒸留水 (pH11、NaOH で調整、100 µl)、各種ポリフェノール溶液 (100 µl) および NBT 溶液 (100 µl) を混合した試験区を用意した。混合溶液には TritonX-100 を 0.1% (v/v) または蒸留水を加えた。混合溶液を室温下で 30 分間静置した後、乳酸 (200 µl) を加えて MgO を溶解した。12,000×g で 10 分間遠心後、蒸留水で 2 回、さらに 99%エタノールで 2 回洗浄した。ペレットを 1 ml の溶解液 (DMSO、2M KOH (1.6 : 1) で溶解した後 630 nm の吸光度を測定し、スタンダード溶液を用いた検量線によってフォルマザンを定量した。

9-5. トマト根部組織に蓄積する $O_2^{\cdot-}$ の検出

生育させたトマトの根部を 1% の UCM250 (蒸留水に懸濁) 懸濁液に浸漬し、25°C、白色光照射下 (光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で 6 時間静置した。その後、根部を NBT 溶液 (NBT 0.1% およびアジ化ナトリウム 10 mM を含有するリン酸カリウムバッファー (pH 7.8)) に浸漬し、アスピレーターを用いてさらに溶液を組織中に浸透させた。10 分程度インキュベートした後、 $O_2^{\cdot-}$ との反応によって蓄積するフォルマザンを観察した。

10. 組織学的分析

10-1. トマト胚軸部における β -1,3-glucanase 蓄積の検出

生育したトマト個体 (品種: 桃太郎) に 0.7% (w/v) の UCM250 (蒸留水に懸濁) 懸濁液を 50 ml 灌注処理し、25°C、12 時間の明期条件下 (光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で生育させた。MgO 処理 7 日後に胚軸部を回収し、5% グルタルアルデヒド含有カコジル酸バッファー (pH 7.0) に一晩浸漬した。組織の脱水、パラフィン置換、切片作成および脱パラフィンの方法は Fig. 20 に示す。 β -1,3-glucanase の局在はタバコ PR-N (class II acidic β -1,3-glucanase) 抗体 (Niki *et al.*, 1998) を用いて観察した。

VECTASTAIN ABC Rabbit IgG Kit (Vector Laboratories) によるジアミノベンジジン (DAB) を基質とした検出系では、内在性ペルオキシダーゼを失活させるために胚軸組織切片を 3% 過酸化水素で 5 分間処理した。さらに Tris-buffered saline (TBS; pH 7.4) で 2 回洗浄し、ヤギ正常血清で 30 分間ブロッキングを行った後、PR-N 抗体 (TBS で 3000 倍に希釈) で 60 分間処理した。この切片を TBS で 2 回洗浄した後、ビオチン標識抗ウサギ IgG (ヤギ) 抗体で 30 分間処理し、さらに TBS で 2 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ビオチン-アビジン溶液で 30 分間処理した。次に TBS で 2 回洗浄した後、DAB 溶液 (0.03% DAB および 0.02% H_2O_2 含有 50 mM Tris-buffer (pH 7.6)) を 20 分程度処理し、DAB の茶褐色の発色を光学顕微鏡 (Olympus BH-2; Olympus) で観察した。

NBT を基質とした検出系では、内在性アルカリフォスファターゼを失活させるために切片を 15% 酢酸で 15 分間処理した。この切片を TBS で 2 回洗浄した後、ブロッキング溶液 (2% BSA および 0.05% Tween 20 含有 TBS) で 60 分間処理し

た後、PR-N 抗体 (0.3% BSA および 0.05% アジ化ナトリウム含有 TBS) で 60 分間処理した。さらに TBS で 2 回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG (ヤギ) 抗体で 60 分間処理した。これを TBS で 2 回洗浄した後、5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (Wako Pure Chemical) で 30 分間処理し、NBT の還元反応によって生じる青紫色のフォルマザンの発色を光学顕微鏡 (Olympus BH-2; Olympus) で観察した。

10-2. トマト胚軸部におけるチロース蓄積の検出

生育したトマト個体 (品種: 桃太郎) に 0.7% (w/v) の UCM250 (蒸留水に懸濁) 懸濁液を 50 ml 灌注処理し、25°C、12 時間の明期条件下 (光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で生育させた。MgO 処理 7 日後に胚軸部を回収し、5% グルタルアルデヒド含有カコジル酸バッファー (pH 7.0) に一晩浸漬した。前記と同様の方法で作製した組織切片に 0.5% カルコフルオール (Fluorescent brightener 28; WAKO) を室温、暗黒下で 30 分間処理した。染色後、50% グリセロールで切片をマウントし、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; BIORREVO, Keyence) を用いて蛍光を観察した。チロースの主成分である β -グルカン由来の青色蛍光は DAPI-BP (励起波長 360/40、吸収波長 460/50) BZ フィルタを用いて検出した。

10-3. トマト胚軸部における *R. solanacearum* 感染様式の免疫染色

生育したトマト個体 (品種: 桃太郎) に 0.7% (w/v) の UCM250 (蒸留水に懸濁) 懸濁液を 50 ml 灌注処理し、25°C、12 時間の明期条件下 (光量子束密度 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で生育させた。トマトの根を水道水で洗浄することにより MgO 粒子を除いた。洗浄後、根に前記と同様の方法で接種を行った。接種 9 日後に胚軸部を回収し、5% グルタルアルデヒド含有カコジル酸バッファー (pH 7.0) に一晩浸漬した。組織の脱水、パラフィン置換および脱パラフィンの方法は Fig. 20 に示す。トマト胚軸組織内における *R. solanacearum* の局在は *R. solanacearum* No.2 抗体 (d'Ursel et al., 1999) を用い、前述のジアミノベンジジン (DAB) を基質とした検出系で観察した。*R. solanacearum* No.2 抗体は TBS で 3000 倍に希釈して使用した。

1.Fixed specimens were immersed in t-butyl alcohol after dehydration through a graded series of t-butyl alcohol-ethanol.

- (a) 50% ethanol, overnight
- (b) 10% *t*-butanol, 40% ethanol and 50% DW, 1 to 3 hours
- (c) 20% *t*-butanol, 50% ethanol and 30% DW, 1 to 3 hour.
- (d) 35% *t*-butanol, 50% ethanol and 15% DW, 1 to 3 hours
- (e) 55% *t*-butanol and 45% ethanol, 1 to 3 hours
- (f) 75% *t*-butanol and 25% ethanol, 1 to 3 hours
- (g) 100% *t*-butanol, 1 to 3 hours (three times)

2. Embedded in paraffin. These steps are done in a 60°C.

- (a) Butanol : paraffin (1:1), 2h
- (b) 100% paraffin, 2h (twice)

3. Paraffin was removed in Histo Clear (Cosmo bio) and sections were hydrated in a graded series of ethanol to water.

- (a) Histo Clear, 30 min (twice)
- (b) 100% ethanol, 10 min
- (c) 95% ethanol, 10min
- (d) 90% ethanol, 10 min
- (e) 80% ethanol, 10 min
- (f) 70% ethanol, 10 min
- (g) 50% ethanol, 10 min
- (h) DW, 10 min

Fig. 20. Procedures for preparation of tissue sections.

3. 結果

1. MgO ナノ粒子の *R. solanacearum* に対する抗菌性

UCM250 の *R. solanacearum* に対する抗菌性を調べた結果、500 ppm 以上の MgO ナノ粒子を 6 時間処理することによって *R. solanacearum* コロニーが有意に減少し、顕著な殺菌作用を示した (Fig. 21)。

2. MgO ナノ粒子の青枯病発病抑制作用

2-1. トマト青枯病発病抑制作用

MgO ナノ粒子は *R. solanacearum* に対して抗菌性を有することから、トマトへの *R. solanacearum* 接種直後に MgO ナノ粒子を灌注処理することによる青枯病発病抑制効果を調べた。その結果、青枯病に特徴的な葉の萎凋症状は 0.1% UCM250 処理によってわずかに抑制されたが、1% UCM250 処理区では水を処理したコントロールと同程度の病徴の進展を示した (Fig. 22)。次に、MgO ナノ粒子がトマトに青枯病抵抗性を誘導するかどうか明らかにするため、トマトに MgO ナノ粒子を灌注処理して 3 - 10 日間栽培し、根を洗浄した後 *R. solanacearum* を接種し、病徴の進展を観察した。その結果、0.5 - 1% の UCM250 を 7 日間前処理した場合に最も顕著な病徴の進展抑制効果がみられた (Fig. 23 および Fig. 24)。短期間 (3 日) の MgO ナノ粒子前処理や、低濃度 (0.1%) の MgO ナノ粒子処理にも同様に病徴進展の抑制効果がみられたが、その程度には実験ごとにばらつきがあった (データ未記載)。また、10 日間以上 MgO ナノ粒子を前処理した際、トマトの根にネクロシス様の症状がみられた (データ未記載)。

UCM250 を 7 日間前処理したトマトに *R. solanacearum* 接種し、接種 9 日後の胚軸部および根の細菌数を計測した。その結果、MgO ナノ粒子を前処理したトマトの胚軸部ではコントロールと比較して、*R. solanacearum* 生菌数が有意に少なく、また根においても生菌数の減少傾向がみられた (Fig. 25)。

2-2. シロイヌナズナに対する *R. solanacearum* 抵抗性誘導作用

MgO ナノ粒子がシロイヌナズナに *R. solanacearum* 抵抗性を誘導するかどうかを明らかにするため、各種酸化金属を灌注後 3 日間栽培し、根を洗浄した後 *R. solanacearum* を接種し、病徴の進展を観察した。その結果、UCM250 および 500A

を前処理した場合に、コントロールと比較して萎凋症状の顕著な減少がみられた (Fig. 26)。また、UCM250 は 0.05–0.1% の濃度で、500A は 0.01 - 0.1% の濃度でそれぞれ病徴の進展を抑制し、粒子サイズの小さな 500A はより低濃度でも *R. solanacearum* 抵抗性を誘導した (Fig. 27)。一方、0.1% の CaO および ZnO (0.02 μm) の前処理は病徴の進展を抑制しなかった (Fig. 26)。

3. 抵抗性関連遺伝子発現解析

3 - 1. トマトの抵抗性関連遺伝子発現パターン解析

UCM250 あるいは水 (コントロール) 処理後、12、24、72 および 120 時間後のトマト胚軸および根を回収し、*PR1*、*LoxA*、*PIN2*、*Osm*、*Chi3* および *GluA* 遺伝子発現の変動を解析した。まず、SA 依存的な *PR1*、*GluA* および *Chi3* 遺伝子の発現を調べた。*PR1* 遺伝子は、根において MgO ナノ粒子処理 12 時間で発現が増加し、処理 72 時間後に最も高い値を示した。また、*PR1* 遺伝子は胚軸において MgO ナノ粒子処理 72 時間後から発現が増加していた。*Chi3* 遺伝子は、根において MgO ナノ粒子処理 12 時間から 72 時間の間に発現が増加した。*GluA* 遺伝子は、MgO ナノ粒子処理した根において処理 24 時間後に発現の増加がみられ、胚軸部において 72 - 120 時間後に発現が増加した。また、胚軸部においては MgO ナノ粒子処理 12 - 120 時間のすべての期間で発現増加していた (Fig. 28)。JA 依存的な *LoxA* および *PIN2* 遺伝子発現を調べた結果、*LoxA* は MgO ナノ粒子処理後 24 時間後を除き、根において発現が増加し、胚軸部においては MgO ナノ粒子処理 72 時間以降に発現が増加した。また *PIN2* は、根および胚軸部において MgO ナノ粒子処理 72 時間以降に発現の増加が確認された。ET 依存的な *Osm* 遺伝子は、根において MgO ナノ粒子処理 12 - 24 時間後に発現が増加し、また胚軸部においては MgO ナノ粒子処理 24 - 120 時間後の間に発現が増加した (Fig. 29)。これらの結果から、MgO ナノ粒子処理はトマトに局所的 (根) および全身的 (胚軸) な SA、JA および ET 誘導性抵抗性関連遺伝子発現を誘導することが明らかになった。

3 - 2. シロイヌナズナの抵抗性関連遺伝子発現パターン解析

MgO ナノ粒子処理によって変化するシロイヌナズナの抵抗性関連遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR によって調べた。500A または水 (コントロール) 処理後、12、24、48 および 72 時間後に根および地上部を回収し、*PR1*、*PR2*、*PR3*、*PR4*、

PR5、*PDF1.2*、*Thi2.1*、*AKN2*、*ASA1*、*ATR1* および *DHS1* 遺伝子発現の変動を解析した。MgO ナノ粒子処理を行った根では、SA 誘導性遺伝子である *PR1*、*PR2* および *PR5* の発現増加がみられ、*PR1* は処理 12 時間後、*PR2* および *PR5* は処理 48 時間後に発現が増加した。また、JA/ET 誘導性遺伝子である *PR3*、*PR4*、*PDF1.2* および *Thi2.1* 遺伝子も同様に MgO ナノ粒子処理による発現増加が確認された (Fig. 30)。トリプトファン代謝に関与する *ASA1* および *DHS1* 遺伝子も MgO ナノ粒子処理によって発現が増加した。一方、トリプトファン代謝の正の調節因子である *ATR1* は、MgO ナノ粒子処理した根において、水を処理したものと比較して半分程度の発現量にとどまった (Fig. 31)。根に MgO ナノ粒子処理を行ったシロイヌナズナの地上部における抵抗性関連遺伝子発現も同様に調べた。*PR1* および *PR2* 遺伝子は、MgO ナノ粒子処理 12 - 48 時間後に発現が増加した。また、*PR3*、*PR4* および *PDF1.2* は処理後 12 - 72 時間後に発現が増加した。さらに、MgO ナノ粒子処理後 12 - 48 時間後において、アブシジン酸シグナル伝達に関与する *ABF1* の発現増加が確認された (Fig. 32)。

500A を前処理することによる、*R. solanacearum* 感染後の抵抗性関連遺伝子発現の変動をリアルタイム RT-PCR によって調べた。接種 24 および 120 時間後の地上部における *PR1*、*PR2*、*PR3*、*PR4*、*PR5*、*PDF1.2*、*CPK4*、*CPK11*、*ERD10*、*ABF1* および *ABI1* 遺伝子発現を解析した。その結果、接種 24 時間後において *PR1*、*PR3* および *PDF1.2* の発現増加がみられ、また *PDF1.2* は 500A 処理個体 (*R. solanacearum* 無接種) においても発現が増加していた (Fig. 33)。アブシジン酸シグナル伝達に関与する遺伝子発現は変動を示さなかった (Fig. 34)。水を前処理したシロイヌナズナ (MgO ナノ粒子無処理) の地上部において、接種 120 時間後に *PR1*、*PR3*、*PR4*、*PDF1.2*、*ERD10* および *ABI1* 遺伝子の顕著な増加が確認された。しかし、MgO ナノ粒子を前処理した個体では遺伝子発現の変動は見られなかった (Fig. 35 および Fig. 36)。これらの結果は、MgO ナノ粒子前処理によって、SA および JA/ET 依存的な抵抗性関連遺伝子が感染ステージの早い段階 (1 dpi) で迅速に誘導されることを示している。

4. MgO ナノ粒子の *R. solanacearum* 抵抗性誘導作用における SA の関与

4-1. トマト青枯病抵抗性誘導作用における SA の関与

MgO ナノ粒子のトマト青枯病抵抗性誘導作用における SA の関与を明らかにす

るため、SA 分解酵素を導入した NahG トマトに MgO ナノ粒子処理を行い、青枯病抵抗性誘導作用の有無を調べた。その結果、MgO ナノ粒子を前処理した WT 個体では青枯病の発病が抑制されたのに対し、NahG 個体では MgO ナノ粒子前処理による病徴進展の抑制作用がみられなかった (Fig. 37)。

MgO ナノ粒子のシロイヌナズナに対する *R. solanacearum* 抵抗性誘導作用における SA、JA および ET の関与を明らかにするため、各種植物ホルモンのシグナル伝達に関与する遺伝子の変異体を用いて青枯病抵抗性誘導作用の有無を調べた。その結果、MgO ナノ粒子を前処理した col-0 個体では萎凋症状進展が顕著に抑制されていたが、サリチル酸生産能が低下した変異体 *sid2-2* 個体への MgO ナノ粒子前処理は萎凋症状の抑制作用を示さなかった。また、エチレン非応答性の変異体 *etr1-1*、ジャスモン酸生合成能の低下した変異体 *fad3-2* および *fad7-1,8* は、MgO ナノ粒子前処理によって col-0 と同程度あるいはそれ以上の病徴進展の抑制効果が確認された (Fig. 38)。

5. MgO ナノ粒子に対する植物のストレス応答

5-1. MgO ナノ粒子処理によるトマト培養細胞内の ROS・NO 蓄積

トマト培養細胞に酸化金属を処理した際の細胞内 ROS 蓄積を CM-H2DCFDA 蛍光プローブを用いて調べた。各種酸化金属 (UCM250、500A、UK650、UGK550、UGK800、UGK1000、CaO、ZnO (~5 μm および 0.02 μm)) を 30 分間処理したところ、UCM250、500A、UGK550、UGK800 および UGK1000 を処理した際に顕著な ROS の蓄積が観察された。特に 500A を処理した細胞では他の MgO ナノ粒子と比較して有意な ROS 蓄積の増加を示した (Fig. 39)。一方で水、CaO および ZnO を処理した際は細胞内の ROS 蓄積がみられなかった (Fig. 40)。500A を処理した細胞内 ROS 蓄積の経時的变化を調べたところ、MgO ナノ粒子処理 30 分後から ROS 蓄積がみられ、60 分後をピークとして ROS 蓄積量が徐々に低下し、処理 240 分後には水を処理した細胞と同程度の値を示した (Fig. 41)。

MgO ナノ粒子処理によるトマト培養細胞内の ROS 蓄積における NADPH オキシダーゼおよび Ca イオンシグナルの関与を調べた。Tiron (O_2^- 除去剤) および DPI (NADPH オキシダーゼ阻害剤) 処理は、500A による培養細胞内 ROS 発生を顕著に阻害した (Fig. 42)。また、BAPTA (カルシウムイオンキレート剤)、TMB-8 (細胞内カルシウムイオン遊離抑制剤)、EGTA (金属イオンキレート剤) および EDTA

(金属イオンキレート剤) 処理により、500A による培養細胞内 ROS 発生量が顕著に低下した。一方、Nifedipin (カルシウムイオンチャンネル阻害剤) 処理は 500A を処理した培養細胞内の ROS 発生を抑制しなかった (Fig. 43)。

トマト培養細胞に MgO ナノ粒子を処理した際の細胞内 NO 蓄積を DAF-2DA 蛍光プローブを用いて検出した。500A を培養細胞に 2 時間処理したところ、30 ppm 以上の MgO ナノ粒子濃度で細胞内の NO 蓄積が観察された (Fig. 44)。

5 - 2. MgO ナノ粒子処理によるトマト培養細胞の細胞死誘導

MgO ナノ粒子のトマト培養細胞に対する細胞死誘導作用を、PI 蛍光プローブを用いて調べた。PI は生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞にのみ入り込み核内の DNA に結合して赤色蛍光を発するため、死細胞の検出用に広く用いられている蛍光色素である (Jones and Senft, 1985)。500A を 6 時間処理した培養細胞の細胞死を調べたところ、水を処理したコントロールと比較して、PI 陽性細胞の顕著な増加が確認された。また、PI 染色による赤色蛍光は核を検出する DAPI 染色陽性部位と同じ局在を示した (Fig. 45)。

5 - 3. ポリフェノールと MgO ナノ粒子との反応によって発生する $O_2^{\cdot -}$ の検出

植物含有成分と MgO ナノ粒子との反応によって発生する $O_2^{\cdot -}$ をフォルマゼン比色法によって調べた。トマトの葉由来の抽出液、脂質、精製タンパク質およびポリフェノールを MgO ナノ粒子懸濁液に混合したところ、トマト抽出液 (データ未記載) あるいはポリフェノールを混合した際に $O_2^{\cdot -}$ の発生がみられた。タンニン酸、ケルセチン、ルチンおよび *p*-クマル酸を MgO ナノ粒子懸濁液に混合したところ、ポリフェノール分子に含まれる水酸基の数に依存した $O_2^{\cdot -}$ 発生量が確認された (Fig. 46)。 $O_2^{\cdot -}$ 発生のタンニン酸および MgO ナノ粒子濃度依存性を調べたところ、タンニン酸濃度に依存的な $O_2^{\cdot -}$ 発生がみられ (Fig. 47)、低濃度の UCM250 を混合した場合でもタンニン酸存在下において $O_2^{\cdot -}$ 発生がみられ、MgO ナノ粒子濃度依存性は確認されなかった (Fig. 48)。

5 - 4. MgO ナノ粒子処理によるトマト根部組織 $O_2^{\cdot -}$ の蓄積

根に MgO ナノ粒子を処理したトマトの根部における ROS の発生を NBT 染色によって調べた。1%の UCM250 を 6 時間処理した根組織において、コントロールと

して水を処理した根部と比較して顕著な $O_2^{\cdot -}$ の発生が確認された (Fig. 49)。

6. 組織学的分析

6-1. MgO ナノ粒子処理によるトマト胚軸内 β -1,3-glucanase の蓄積

根に MgO ナノ粒子を処理したトマト胚軸内 β -1,3-glucanase の蓄積および局在を調べた。MgO ナノ粒子 (UCM250) 処理 7 日後のトマト胚軸において、タバコ PR-N (class II acidic β -1,3-glucanase) ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、木部組織および木部付随柔組織の細胞間隙に β -1,3-glucanase の蓄積が観察された (Fig. 50)。加えて、MgO ナノ粒子処理を行ったトマトの木部組織および木部付随柔組織細胞内において顆粒状構造物の増加が観察された (Fig. 50)。

6-2. MgO ナノ粒子処理によるトマト胚軸内チロースの蓄積

根に MgO ナノ粒子を処理したトマト胚軸内チロースの蓄積を調べた。MgO ナノ粒子 (UCM250) 処理 7 日後のトマト胚軸組織をカルコフルオールで染色したところ、木部付随柔組織細胞内に蓄積した顆粒状構造物が局在する部分において蛍光発生が確認された (Fig. 51)。この結果は、MgO ナノ粒子はトマト胚軸組織において顆粒状の形態を持つチロース蓄積を誘導することを示している。

6-3. MgO ナノ粒子処理によるトマト胚軸内 *R. solanacearum* コロニー形成の抑制

根に MgO を前処理したトマトへの青枯病菌感染時における *R. solanacearum* の局在を、抗 *R. solanacearum* ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色によって観察した。その結果、コントロールとして水を前処理したトマト胚軸組織内では、導管内部や木部組織に顕著な *R. solanacearum* コロニー形成が確認された (Fig. 52 A, B)。一方で MgO ナノ粒子を前処理したトマトでは、コントロールと同様の部位に非常に少ない量の *R. solanacearum* コロニー形成がみられるにとどまった (Fig. 52 C, D)。また MgO ナノ粒子を前処理したトマトでは、導管部において *R. solanacearum* コロニー形成がみられた際、細菌局在部位にチロースの蓄積が確認された (Fig. 52 E, F)。

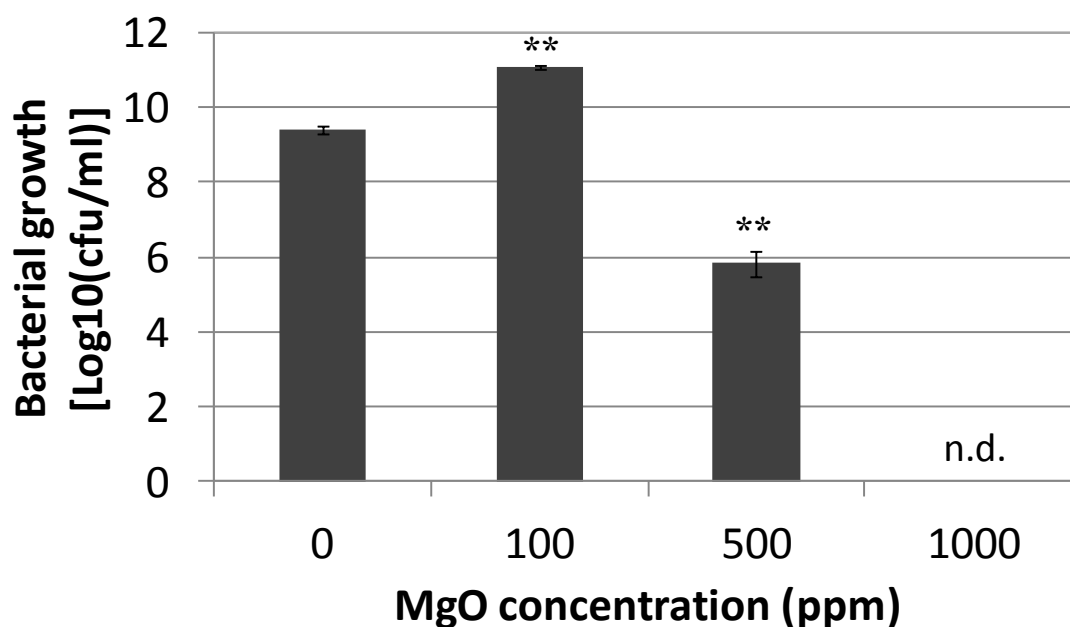


Fig. 21. Antibacterial activity of magnesium oxide nanoparticles against *Ralstonia solanacearum* *in vitro*. Error bars represent the standard errors (n = 3). Data sets marked with asterisks are significantly different from 0 ppm, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$.

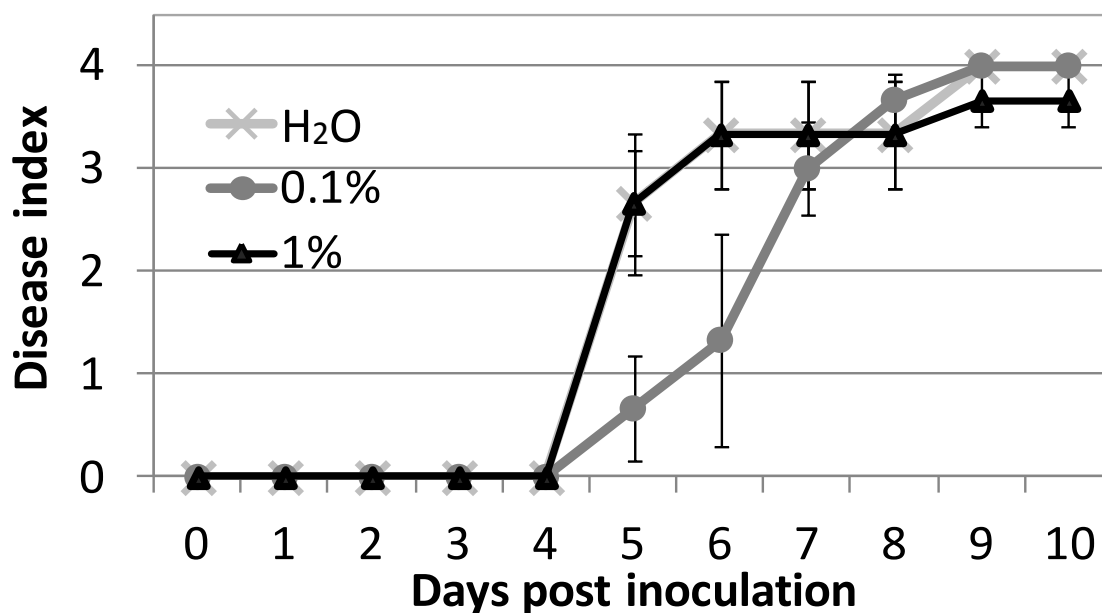


Fig. 22. Effect of magnesium oxide nanoparticles on disease resistance of tomato plants against *Ralstonia solanacearum*. Progression of bacterial wilt symptoms in tomato plants treated with 0.1, 1% MgO NP, or water (H₂O) immediately after inoculation with *R. solanacearum*. Error bars represent the standard errors (n = 3).

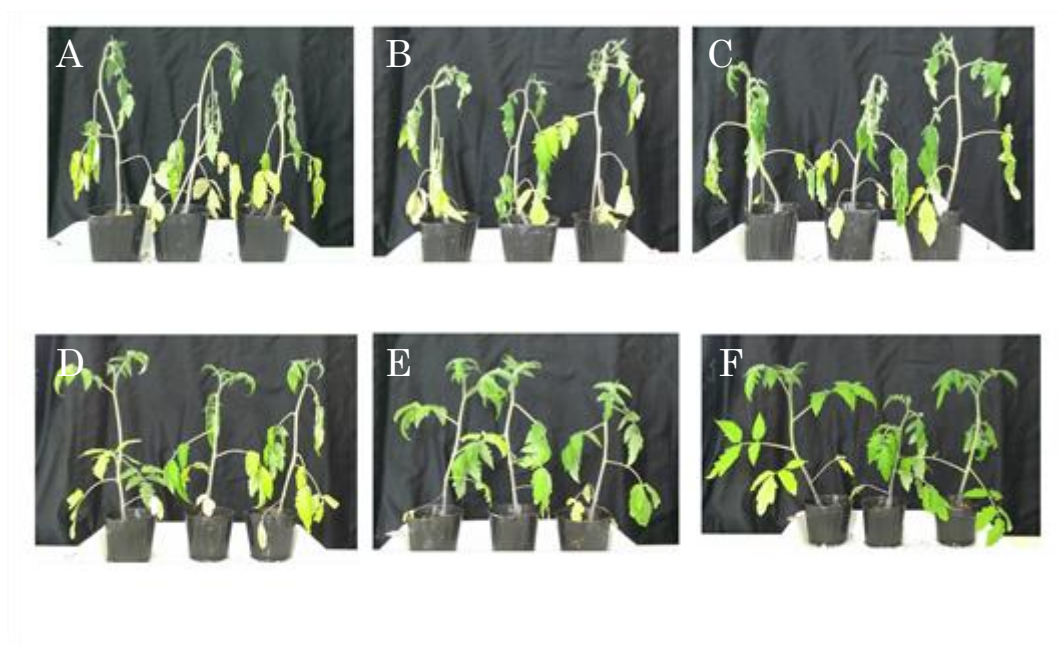


Fig. 23. Effect of magnesium oxide nanoparticles on disease resistance of tomato plants against *Ralstonia solanacearum*. Bacterial wilt symptoms at 5 days after inoculation in tomato plants drenched with 0 to 1% MgO NP or distilled water (control) before inoculation: 0 (A), 0.1 (B), 0.3 (C), 0.5 (D), 0.7 (E) and 1% (F) UCM250.

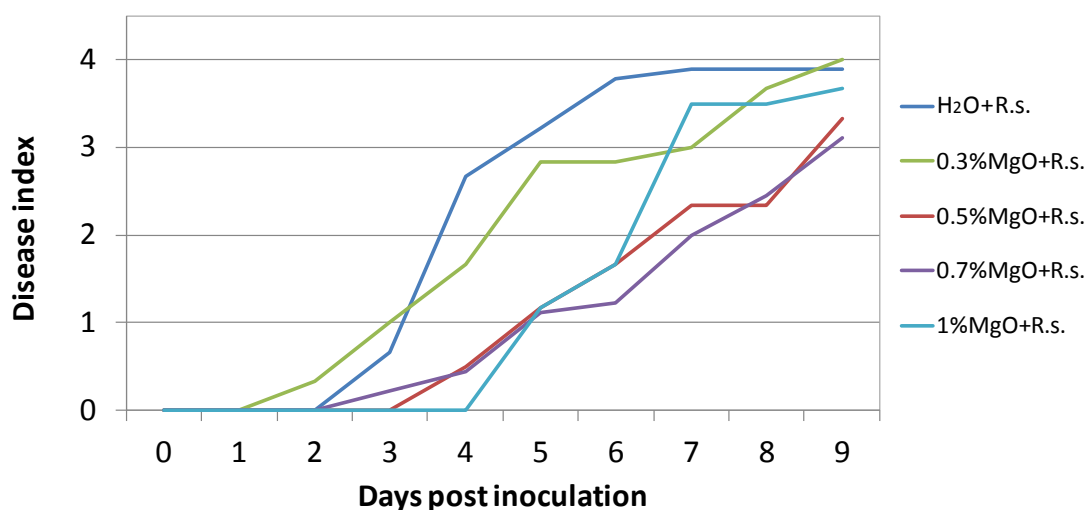


Fig. 24. Effect of magnesium oxide nanoparticles on disease resistance of tomato plants against *Ralstonia solanacearum*. Progression of bacterial wilt symptoms in tomato plants drenched with 0 to 1% MgO NP or distilled water (H₂O) before inoculation. Each value is the mean of at least two independent experiments (n=9).

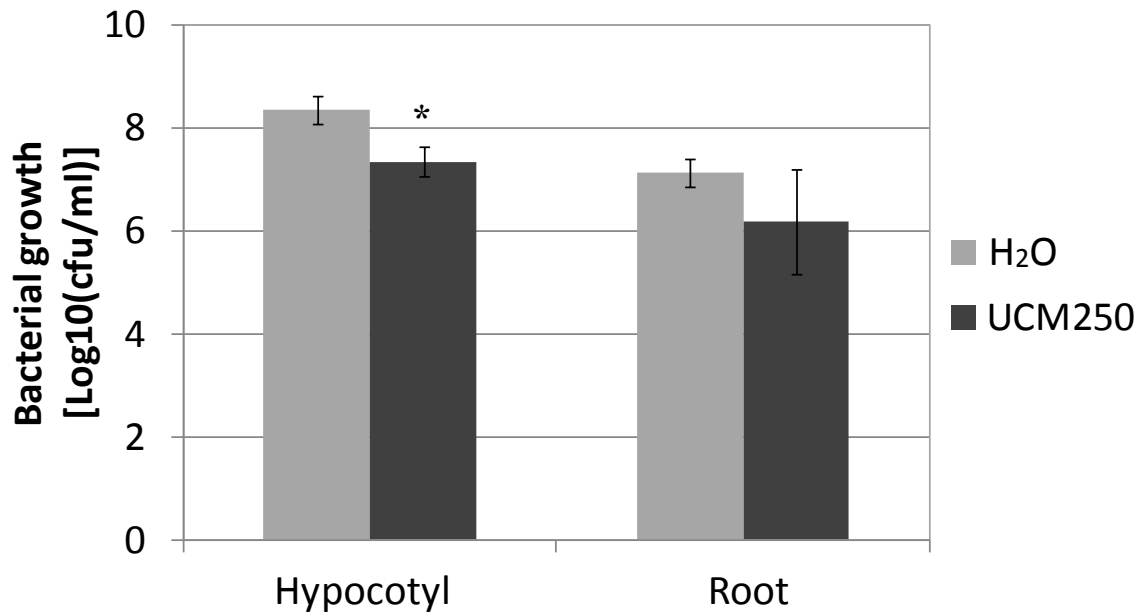


Fig. 25. Bacterial numbers in hypocotyls and roots of tomato plants at 9 days post-inoculation with *R. solanacearum*. Tomato plants were drenched with 0.7% MgO NP or distilled water (H₂O) 7 days before inoculation. Error bars indicate standard errors (n = 6). Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; * indicates $P < 0.05$.

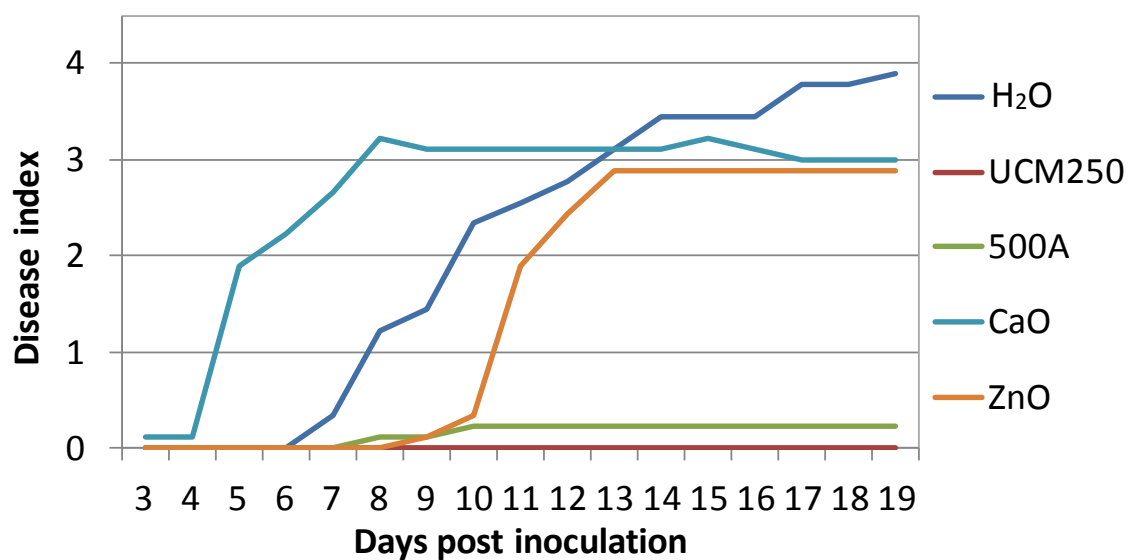


Fig. 26. Effect of metal oxide nanoparticles on disease resistance in *Arabidopsis* plants against *Ralstonia solanacearum*. Progression of bacterial wilt symptoms in *Arabidopsis* plants drenched with 0.1% metal oxide or distilled water (H₂O) before inoculation. Each value is the mean of experiments (n=9).

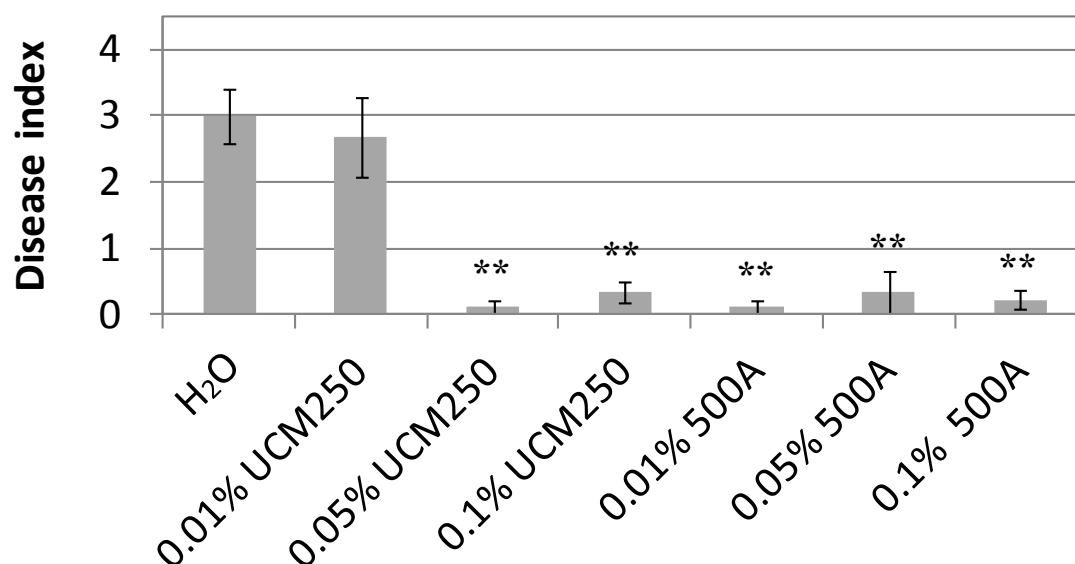


Fig. 27. Effect of magnesium oxide nanoparticles (MgONP) on disease resistance in *Arabidopsis* plants against *Ralstonia solanacearum*. Progression of bacterial wilt symptoms in tomato plants drenched with 0.01 to 0.1% MgONP or distilled water (H₂O) before inoculation. Error bars indicate standard errors (n = 9). Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$.

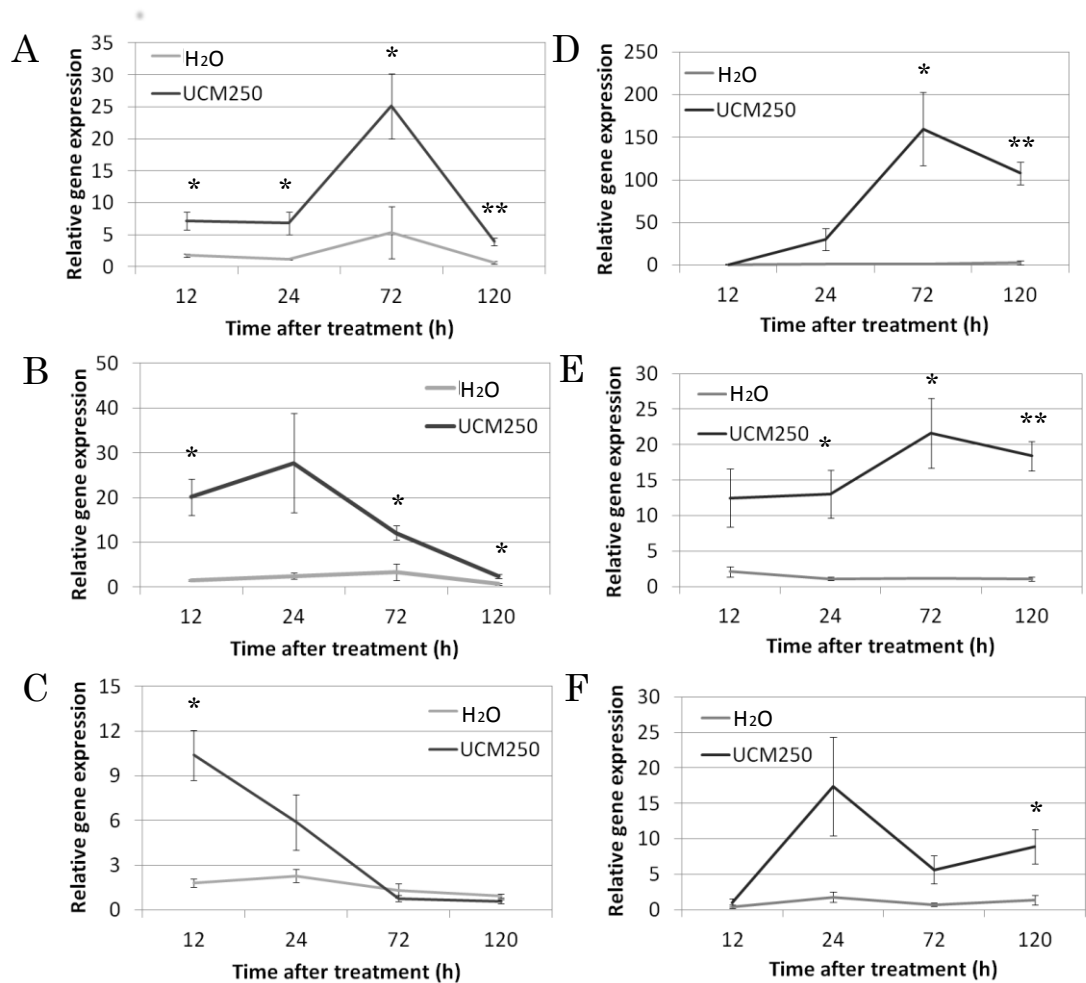


Fig. 28. Expression patterns of SA-dependent genes in tomato plants treated with magnesium oxide nanoparticles. Expressions of *PR1* (A, D), *Chi3* (B, E) and *GluA* (C, F) was assessed in roots (A, B and C) and hypocotyls (E, F and G) of tomato plants at 12, 24, 72 and 120 h after treatment with 0.7% MgO NP or distilled water (H₂O). Error bars indicate standard errors (n = 4). Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates P < 0.01, * indicates P < 0.05.

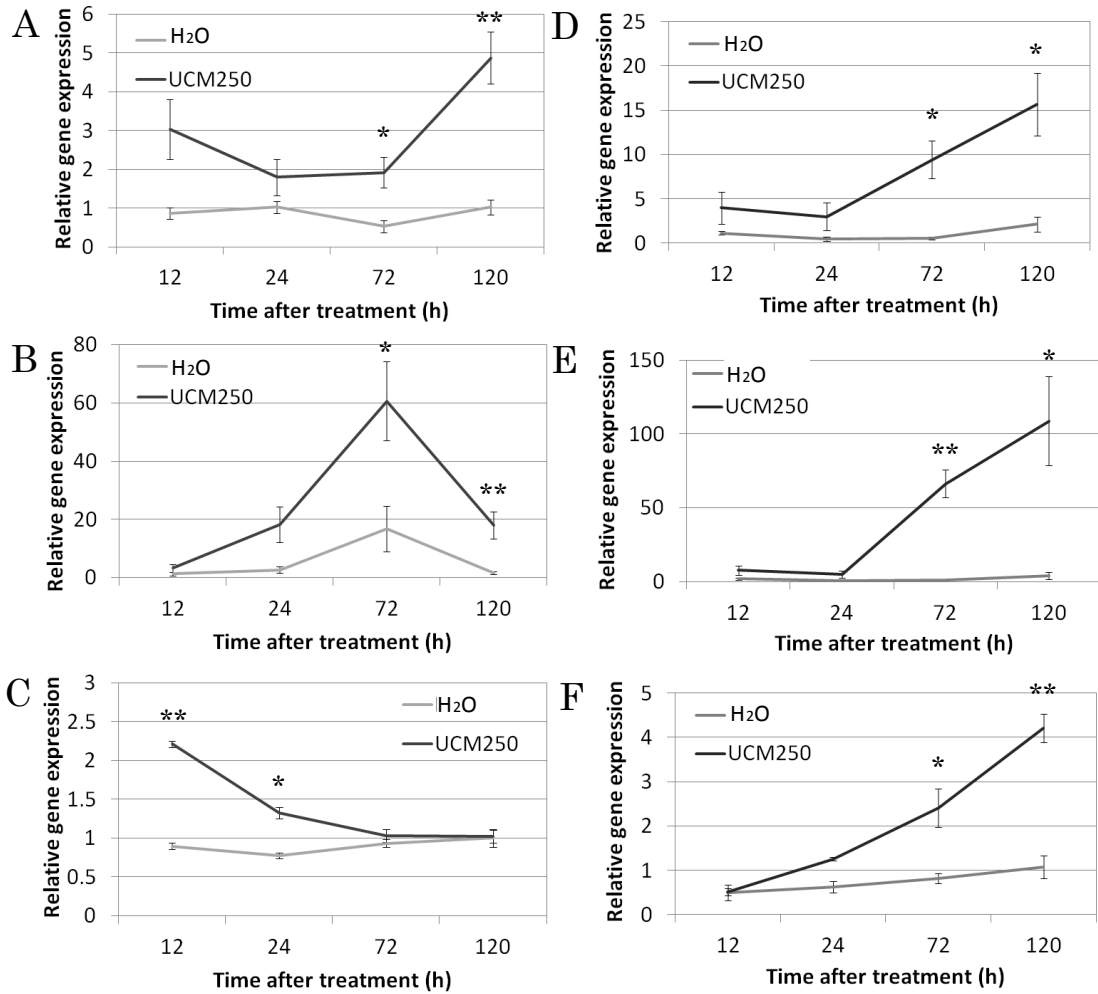


Fig. 29. Expression patterns of jasmonic acid/ethylene-dependent genes in tomato plants treated with magnesium oxide nanoparticles. Expressions of *LoxA* (A, D), *Pin2* (B, E) and *Osm* (C, F) was assessed in roots (A, B and C) and hypocotyls (E, F and G) of tomato plants at 12, 24, 72 and 120 h after treatment with 0.7% MgO NP or distilled water (H₂O). Error bars indicate standard errors (n = 4). Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$, * indicates $P < 0.05$.

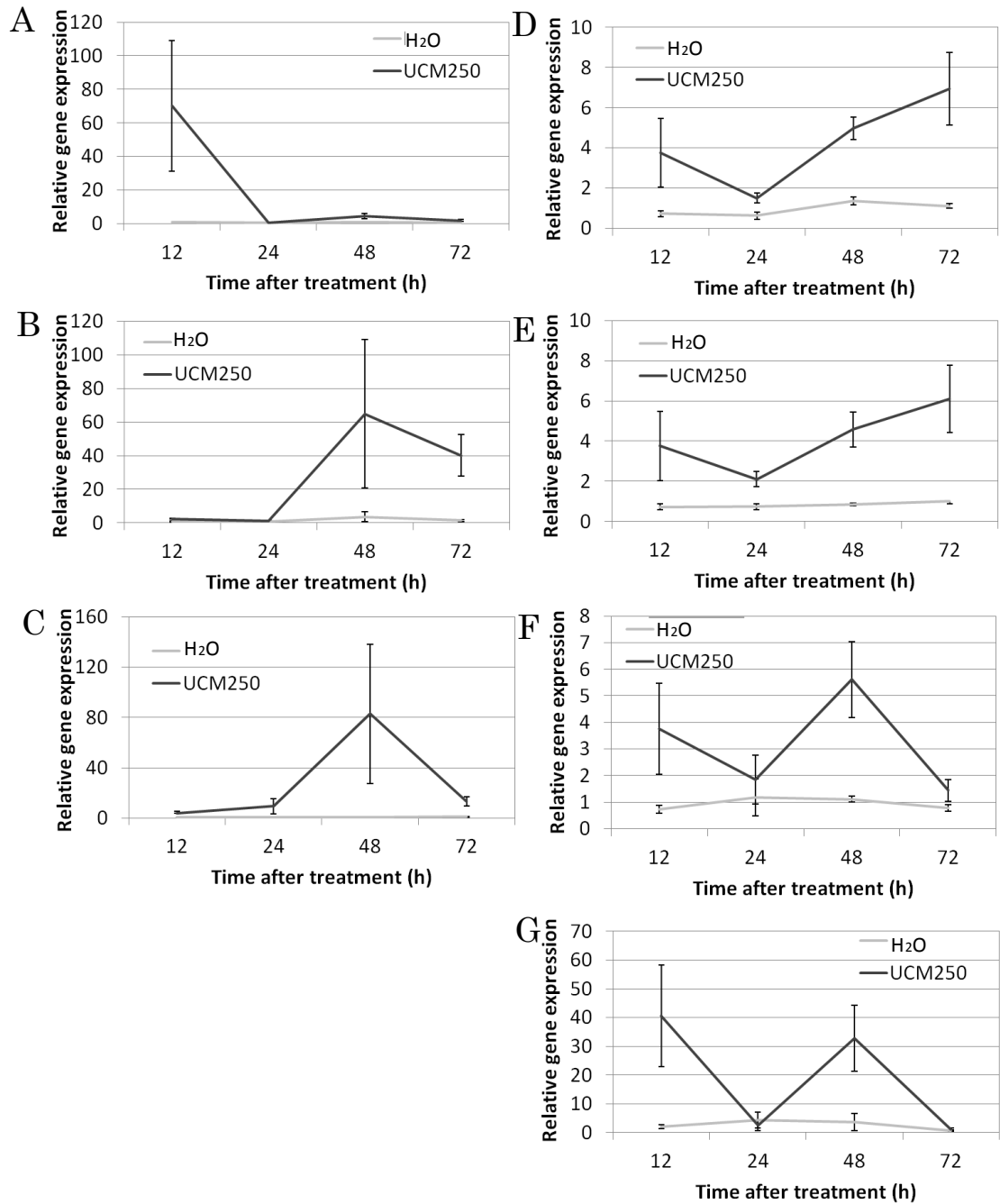


Fig. 30. Expression patterns of defence-related genes in *Arabidopsis* plants treated with magnesium oxide nanoparticles. Expressions of *PR1* (A), *PR2* (B), *PR5* (C), *PR3* (D), *PR4* (E), *PDF1.2* (F) and *Thi2.1* (G) was assessed in roots of *Arabidopsis* plants at 12, 24, 48 and 72 h after treatment with 0.1% MgO NP or distilled water (H₂O). Error bars indicate standard errors (n = 3).

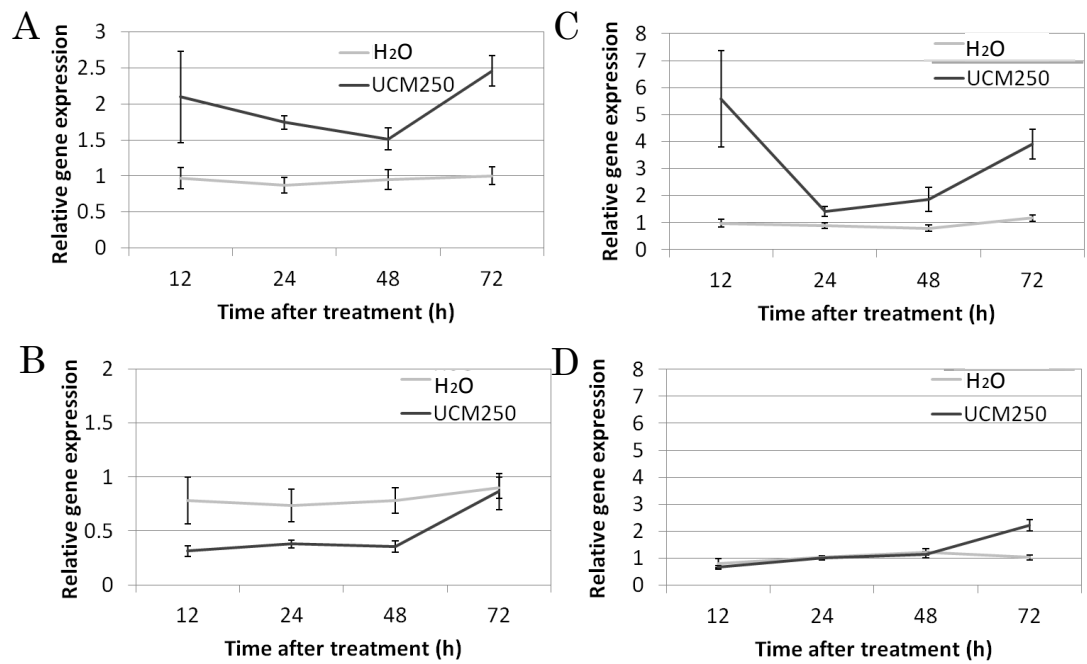


Fig. 31. Expression patterns of tryptophan metabolism-related genes in *Arabidopsis* plants treated with magnesium oxide nanoparticles. Expressions of *DHS1* (A), *ASA1* (B), *ATR1* (C) and *AKN2* (D) was assessed in roots of *Arabidopsis* plants at 12, 24, 48 and 72 h after treatment with 0.1% MgO NP or distilled water (H₂O). Error bars indicate standard errors (n = 3).

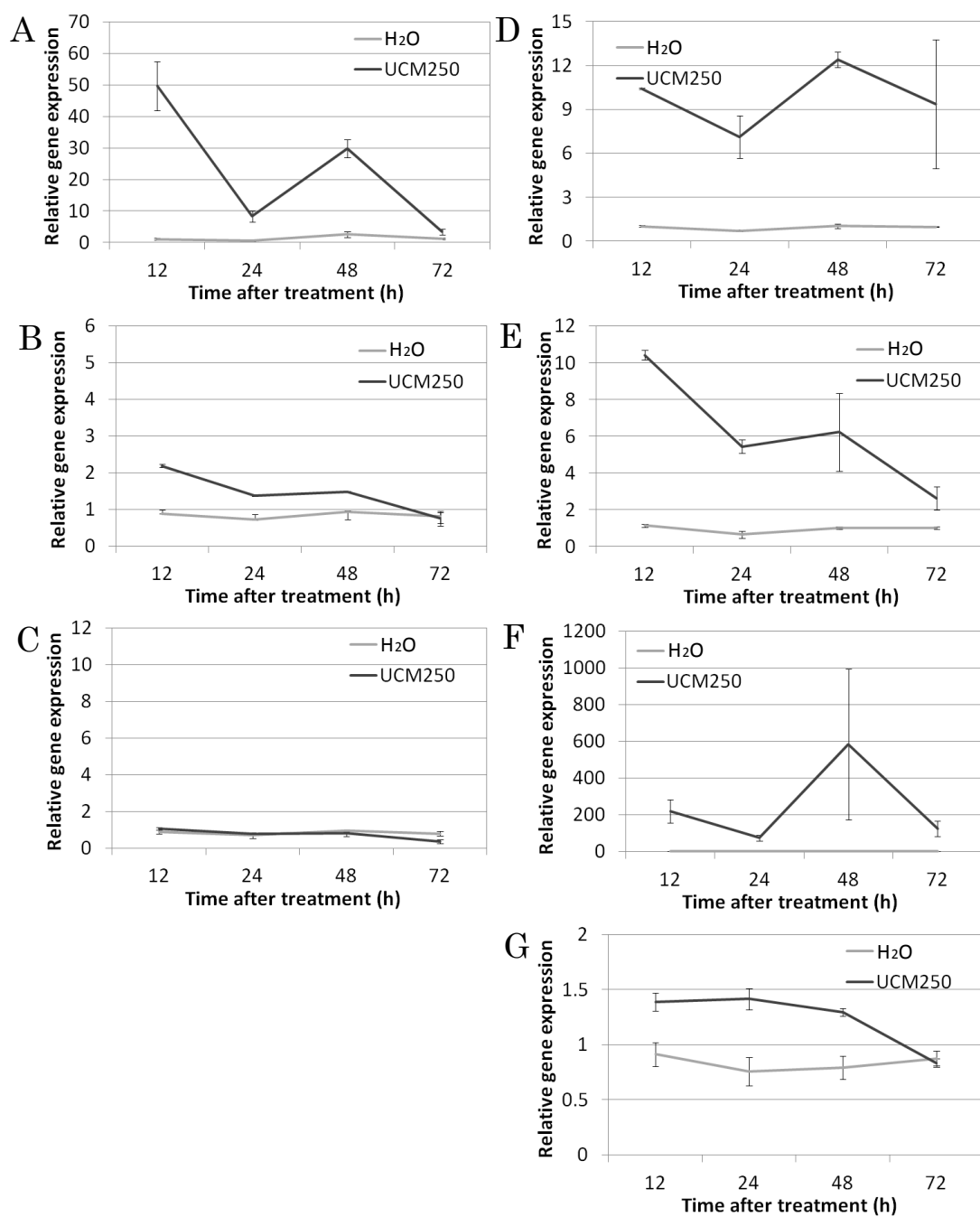


Fig. 32. Expression patterns of signaling maker genes in *Arabidopsis* plants treated with magnesium oxide nanoparticles. Expressions of *PR1* (A), *PR2* (B), *PR5* (C), *PR3* (D), *PR4* (E), *PDF1.2* (F) and *ABF1* (G) was assessed in aerial part of *Arabidopsis* plants at 12, 24, 48 and 72 h after treatment with 0.1% MgO NP or distilled water (H₂O). Error bars indicate standard errors (n = 3).

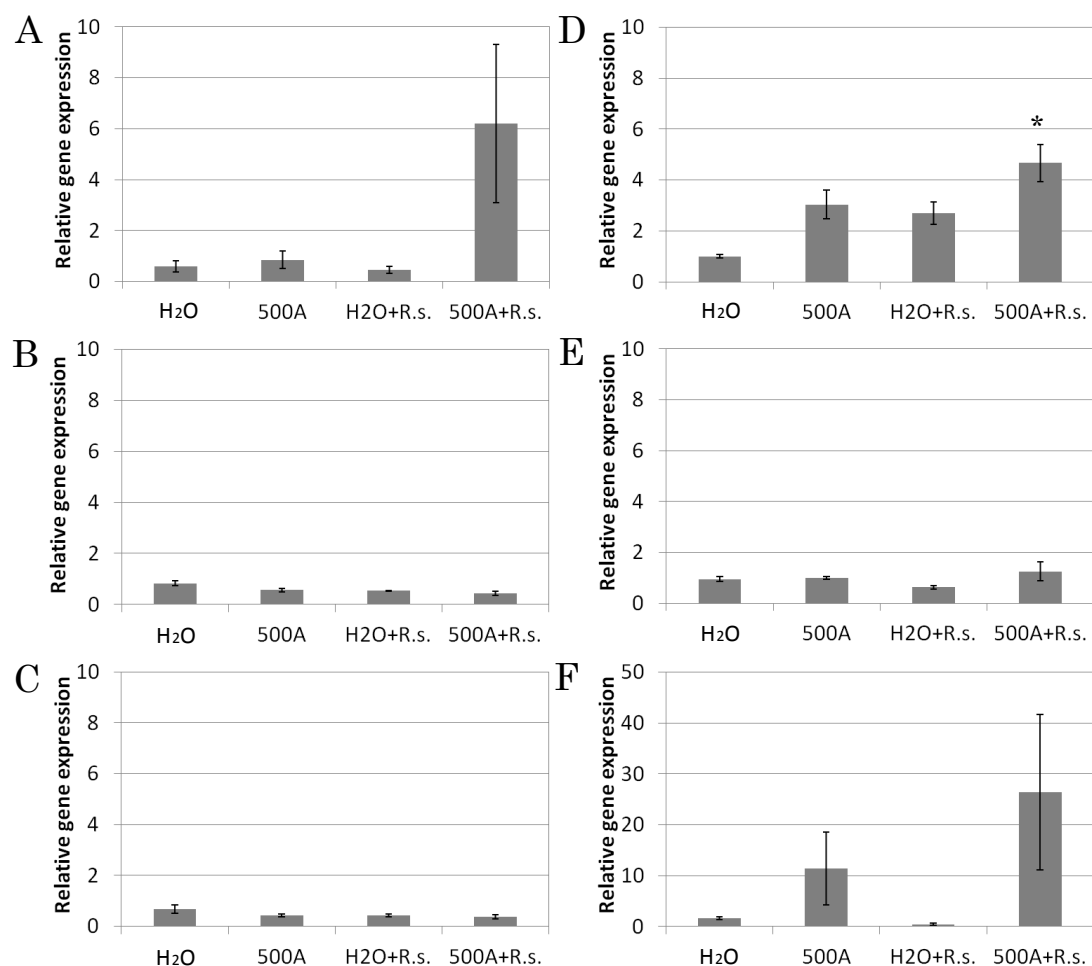


Fig. 33. Expression patterns of defence-related genes in *Arabidopsis* plants treated with magnesium oxide nanoparticles. Expressions of *PR1* (A), *PR2* (B), *PR5* (C), *PR3* (D), *PR4* (E) and *PDF1.2* (F) was assessed in aerial part of magnesium oxide nanoparticles or water pre-treated *Arabidopsis* plants at 24 h after inoculation. Error bars indicate standard errors (n = 3). Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; * indicates P < 0.05.

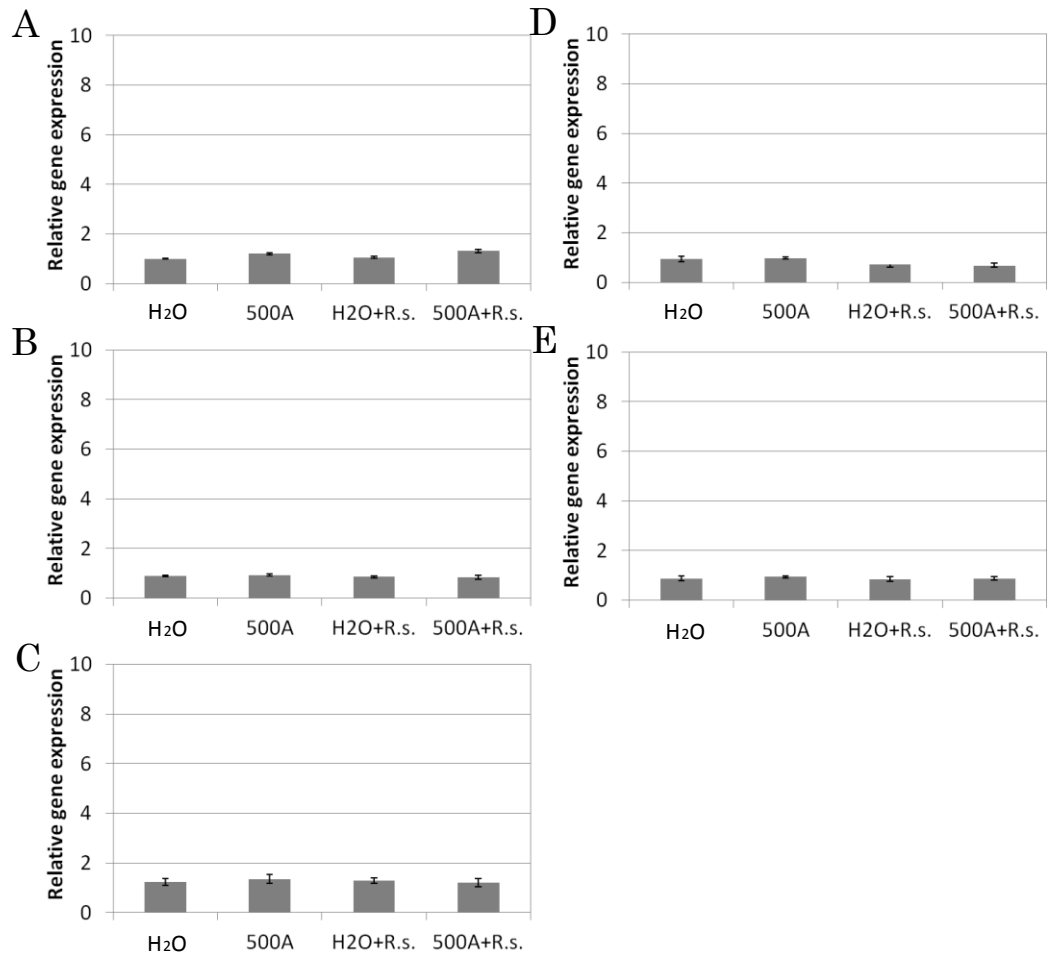


Fig. 34. Expression patterns of abscisic acid signaling-related genes in *Arabidopsis* plants in response to *Ralstonia solanacearum* infection. Expressions of *ABF1* (A), *ABI1* (B), *ERD10* (C), *CPK4* (D) and *CPK11* (E) was assessed in aerial part of magnesium oxide nanoparticles or water pre-treated *Arabidopsis* plants at 24 h after inoculation. Error bars indicate standard errors (n = 3).

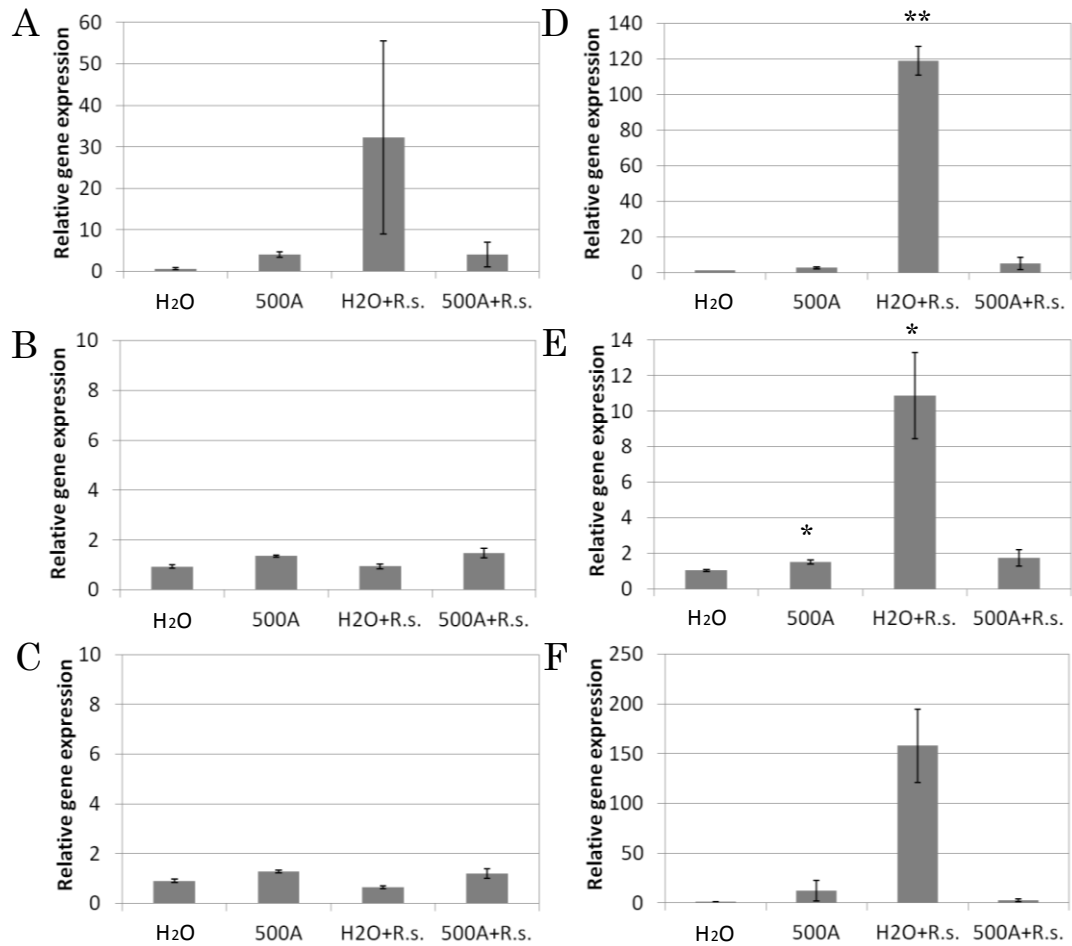


Fig. 35. Expression patterns of defence-related genes *Arabidopsis* plants in response to *Ralstonia solanacearum* infection. Expressions of *PR1* (A), *PR2* (B), *PR5* (C), *PR3* (D), *PR4* (E) and *PDF1.2* (F) was assessed in aerial part of magnesium oxide nanoparticle or water pre-treated *Arabidopsis* plants at 120 h after inoculation. Error bars indicate standard errors (n = 3). Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$, * indicates $P < 0.05$.

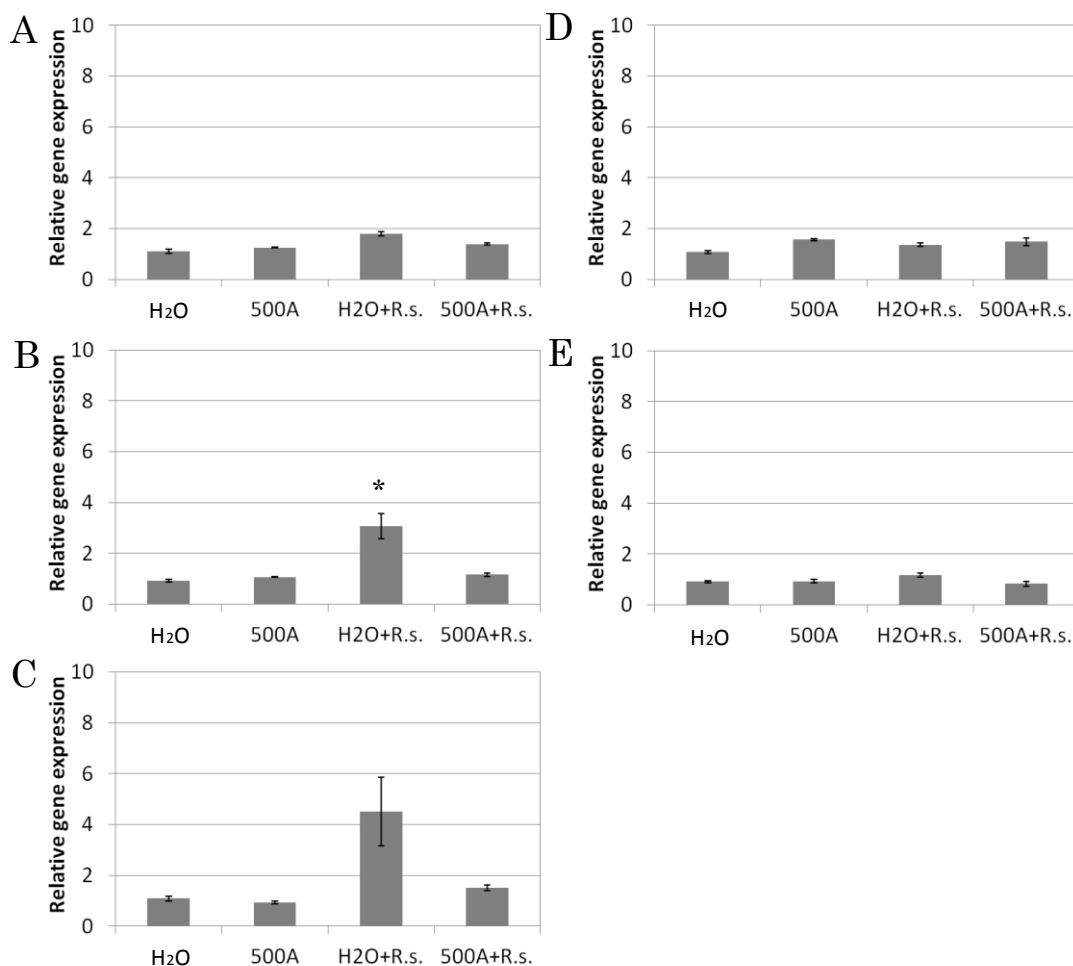


Fig. 36. Expression patterns of abscisic acid signaling-related genes in response of *Arabidopsis* plants to *Ralstonia solanacearum* infection. Expressions of *ABF1* (A), *ABI1* (B), *ERD10* (C), *CPK4* (D) and *CPK11* (E) was assessed in aerial part of *Arabidopsis* plants treated with magnesium oxide nanoparticle or water at 120 h after inoculation. Error bars indicate standard errors (n = 3). Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; * indicates P < 0.05.

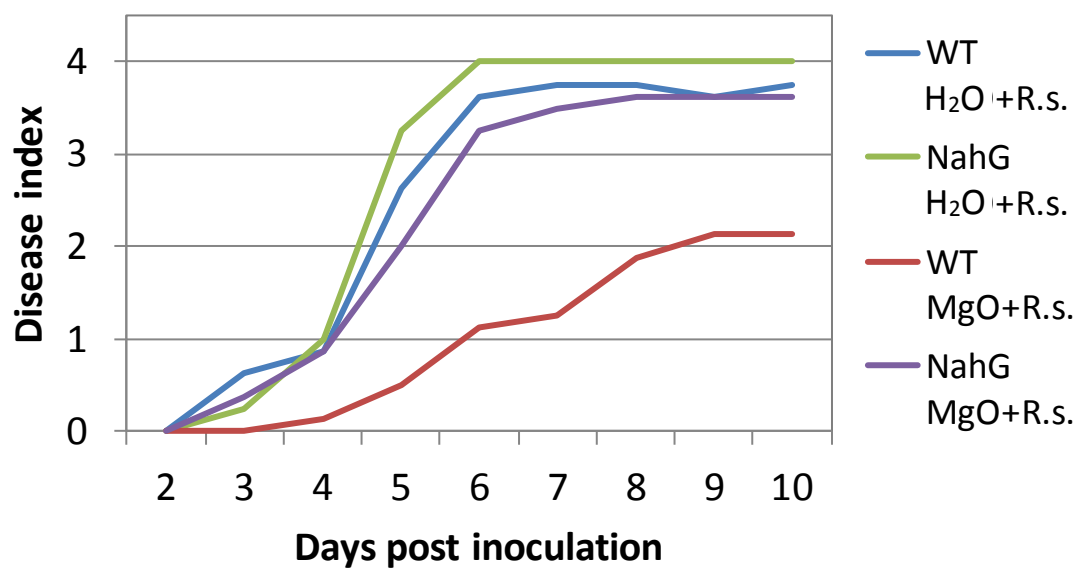


Fig. 37. Development of bacterial wilt symptoms in SA deficient NahG tomato plants. Progression of bacterial wilt symptoms in tomato plants drenched with 0.1% MgO NP or distilled water (H₂O) before inoculation (n=8).

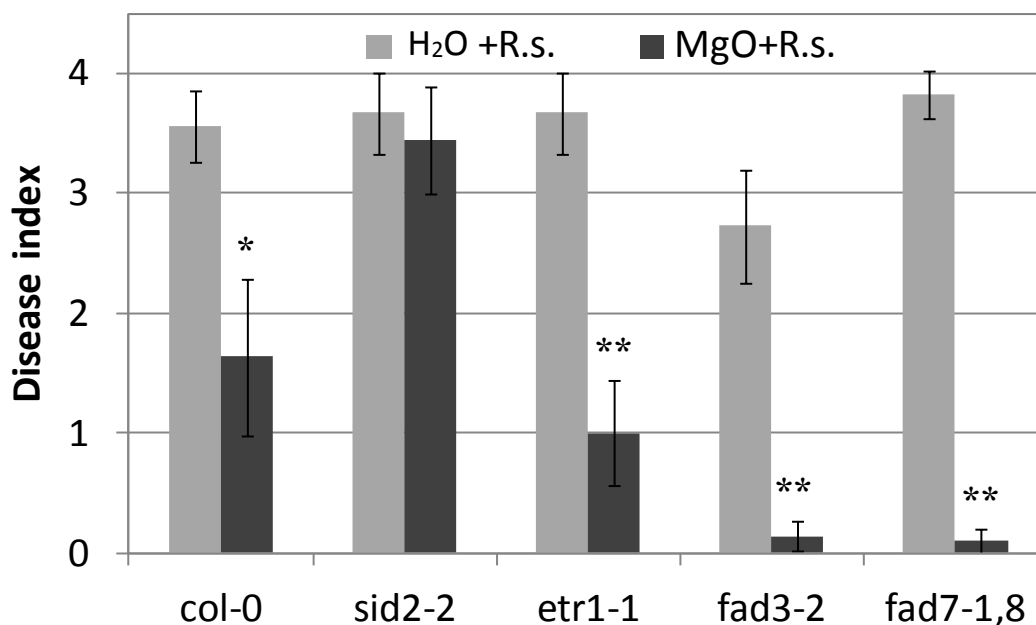


Fig. 38. Development of bacterial wilt symptoms in signaling mutant *Arabidopsis* plants. Progression of bacterial wilt symptoms at 10 days after inoculation in *Arabidopsis* plants drenched with 0.1% MgO NP or distilled water (H₂O) before inoculation. Error bars indicate standard errors (n = 9). Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$, * indicates $P < 0.05$.

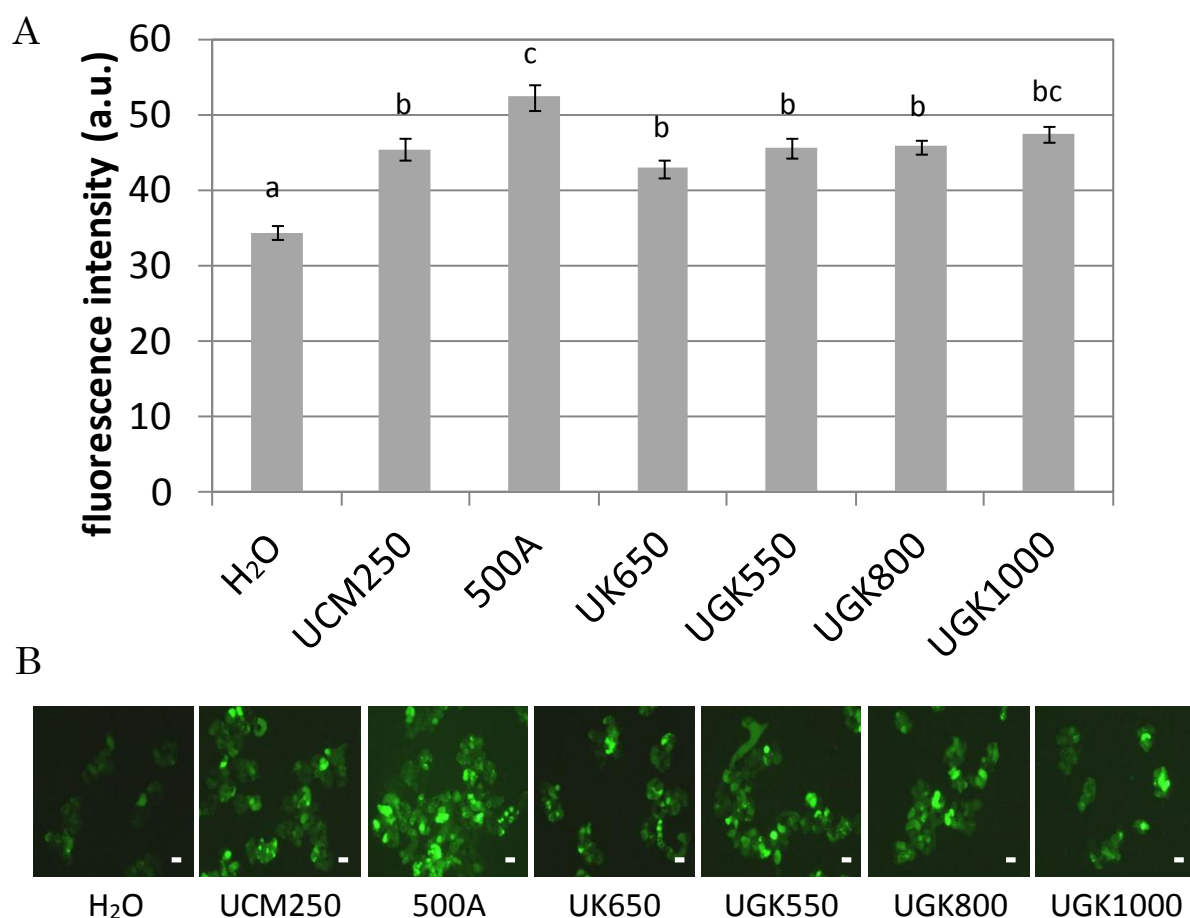
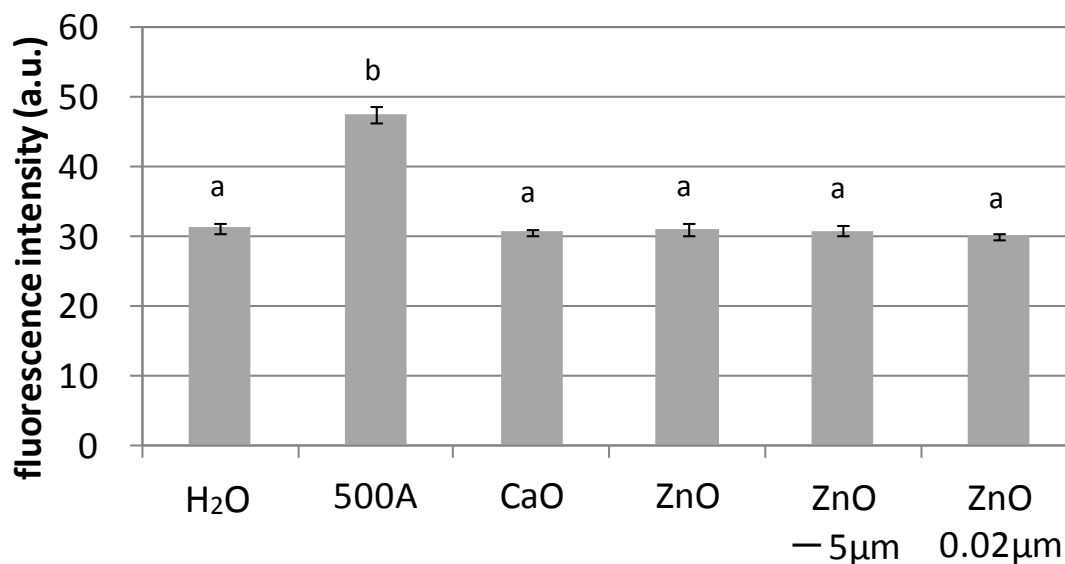


Fig. 39. Detection of ROS generation from tomato suspension-cultured cells treated with different types of magnesium oxide nanoparticles. (A) Fluorescence intensity of tomato suspension-cultured cells treated with different types of magnesium oxide nanoparticles. Error bars indicate standard errors (n=50). The statistically significant differences at $P < 0.05$ were analyzed by one-way ANOVA, followed by a Bonferroni multiple comparison test. (B) Fluorescent microscopy of cell suspensions treated with different types of magnesium oxide nanoparticles and stained with CM-H₂DCFDA.

A



B

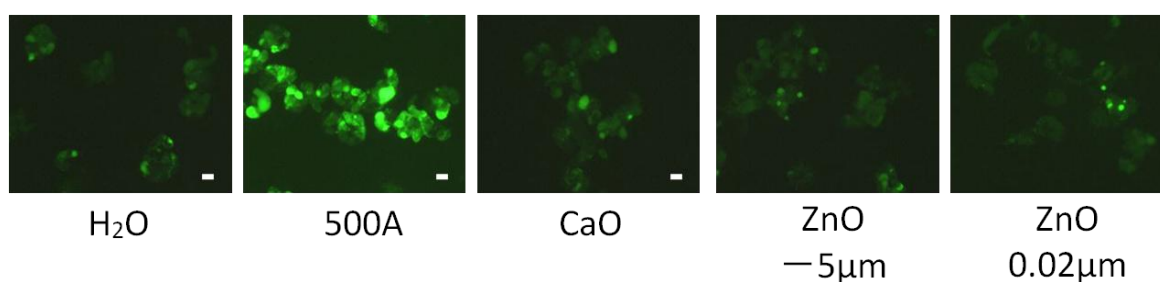


Fig. 40. Detection of ROS generation from tomato suspension-cultured cells treated with metal oxide nanoparticles. (A) Fluorescence intensity of tomato suspension-cultured cells treated with different types of metal oxide nanoparticles. Error bars indicate standard errors (n=50). The statistically significant differences at $P < 0.05$ were analyzed by one-way ANOVA, followed by a Bonferroni multiple comparison test. (B) Fluorescent microscopy of tomato suspension-cultured cells treated with different types of metal oxide nanoparticles and stained with CM-H₂DCFDA.

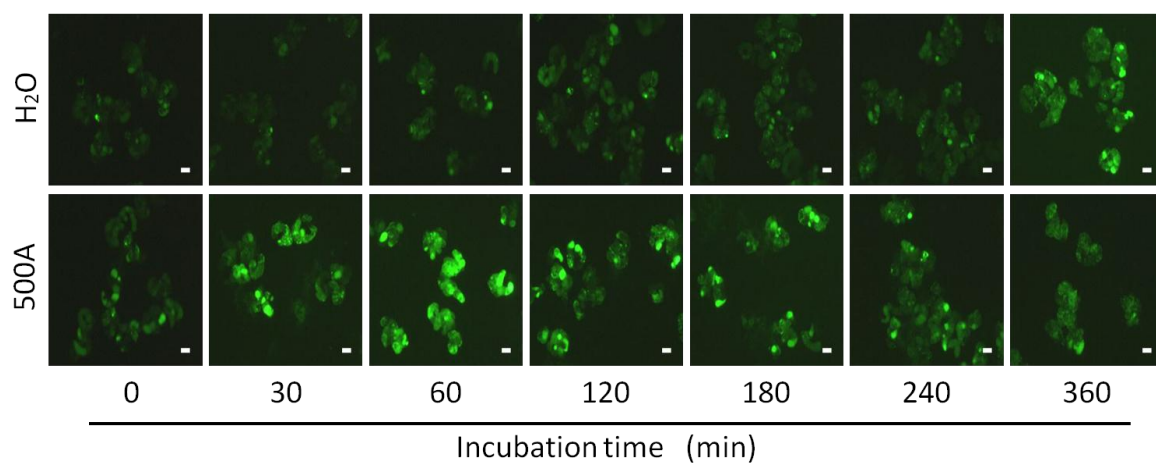
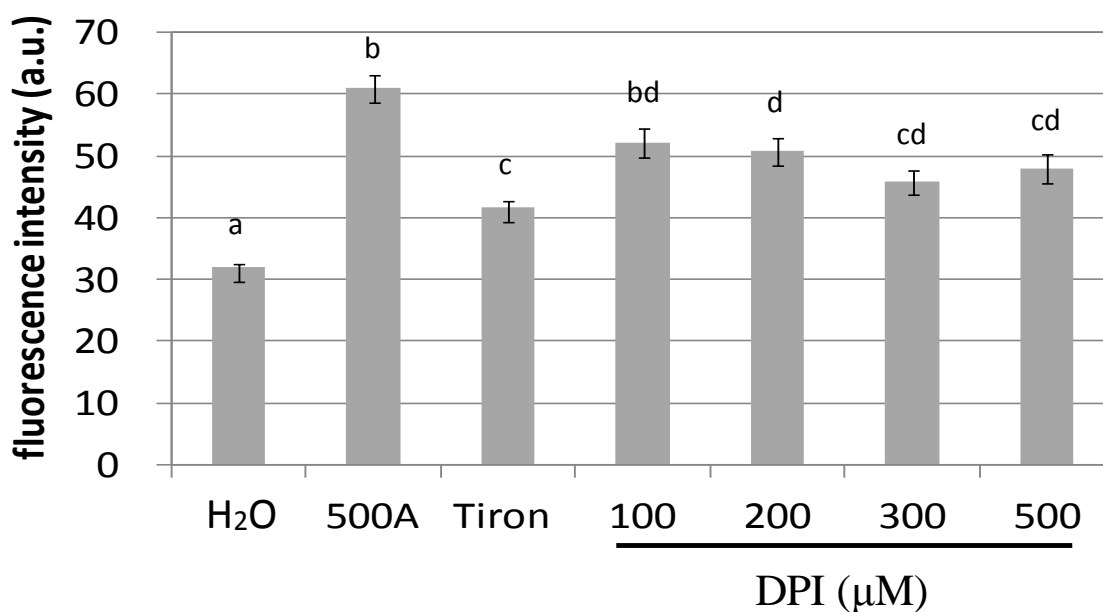


Fig. 41. Detection of ROS generation from tomato suspension-cultured cells treated with magnesium oxide nanoparticles. Fluorescent microscopy of cell suspensions treated with magnesium oxide nanoparticles for 0, 30, 60, 120, 180, 240 and 360 min and stained with CM-H₂DCFDA.

A



B

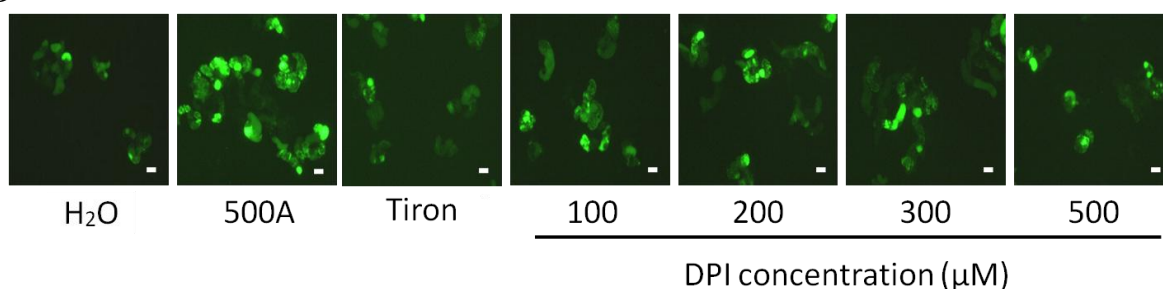
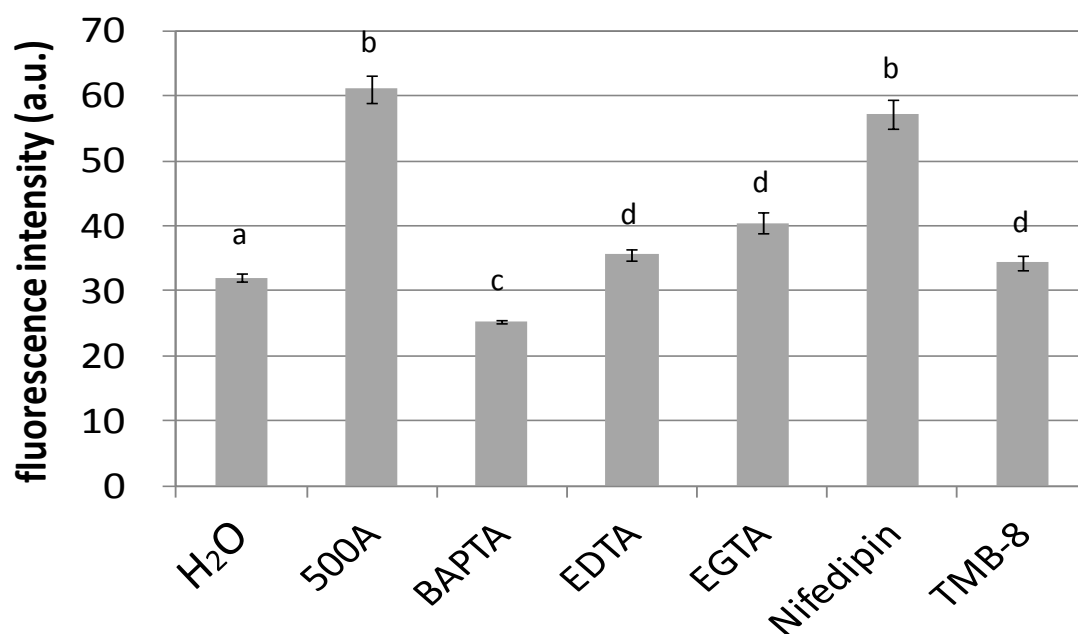


Fig. 42. Effect of a NADPH oxidase inhibitor (DPI) and a super oxide anion scavenger (Tiron) on ROS generation in tomato suspension-cultured cells treated with magnesium oxide nanoparticles. (A) Fluorescence intensity of tomato suspension-cultured cells treated with magnesium oxide nanoparticles in the presence of DPI or Tiron. Error bars indicate standard errors (n=50). The statistically significant differences at $P < 0.05$ were analyzed by one-way ANOVA, followed by a Bonferroni multiple comparison test. (B) Fluorescent microscopy of tomato suspension-cultured cells treated with magnesium oxide nanoparticles and stained with CM-H₂DCFDA in the presence of DPI or Tiron.

A



B

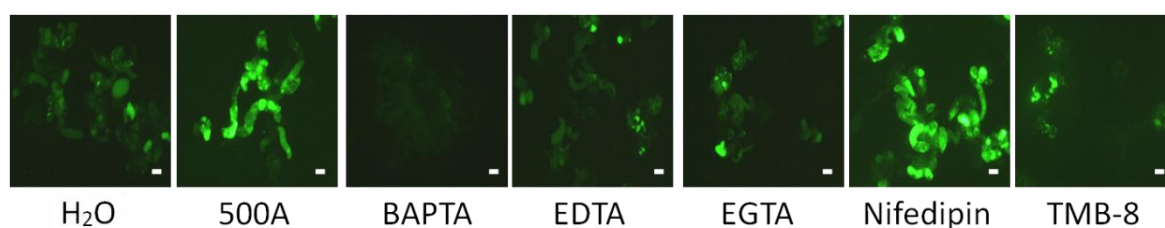


Fig. 43. Effect of calcium ion signaling inhibitors on ROS generation in tomato suspension-cultured cells treated with magnesium oxide nanoparticles. (A) Fluorescence intensity of tomato suspension-cultured cells treated with both of magnesium oxide nanoparticles and calcium ion signaling-inhibitor or scavenger. Error bars indicate standard errors (n=50). The statistically significant differences at $P < 0.05$ were analyzed by one-way ANOVA, followed by a Bonferroni multiple comparison test. (B) Fluorescent microscopy of cell suspensions treated with magnesium oxide nanoparticles and stained with CM-H₂DCFDA.

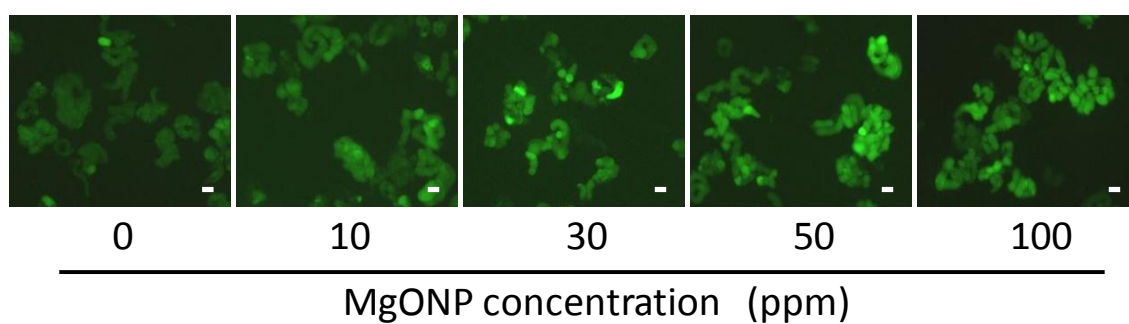


Fig. 44. Detection of ROS generation from in tomato suspension-cultured cells treated with magnesium oxide nanoparticles. Fluorescent microscopy of tomato suspension-cultured cells treated with magnesium oxide nanoparticles for 2 h and stained with DAF-2DA.

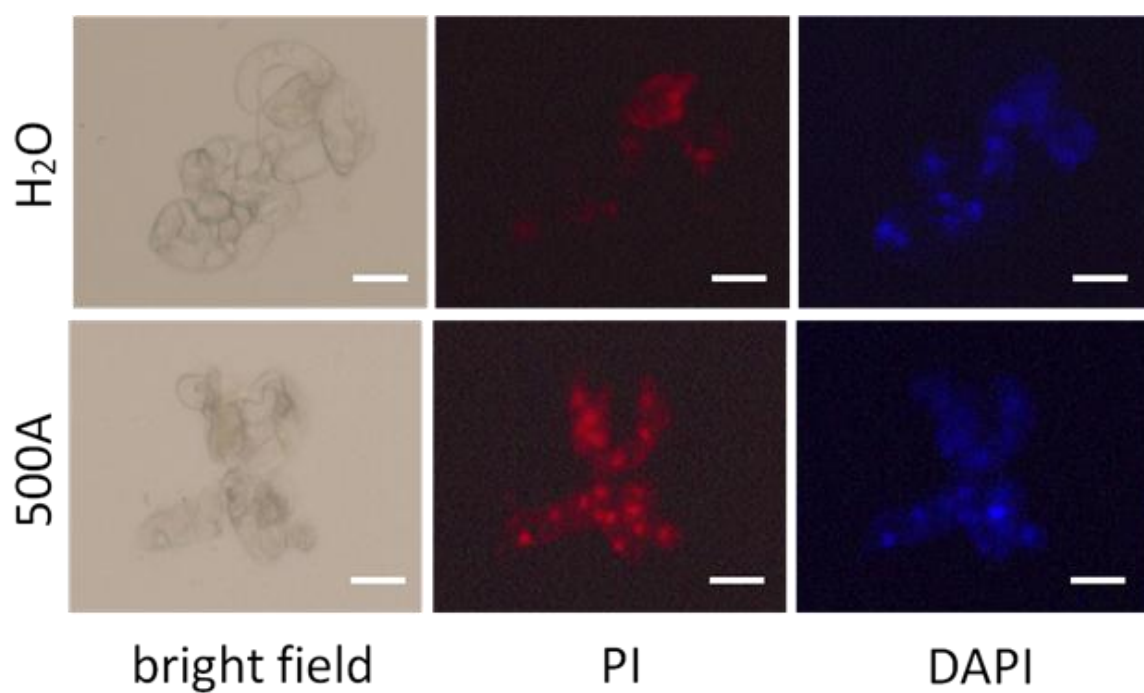


Fig. 45. Detection of cell death in tomato suspension-cultured cells treated with magnesium oxide nanoparticles. Fluorescent microscopy of tomato suspension-cultured cells treated with magnesium oxide nanoparticles for 360 min and stained with PI and DAPI.

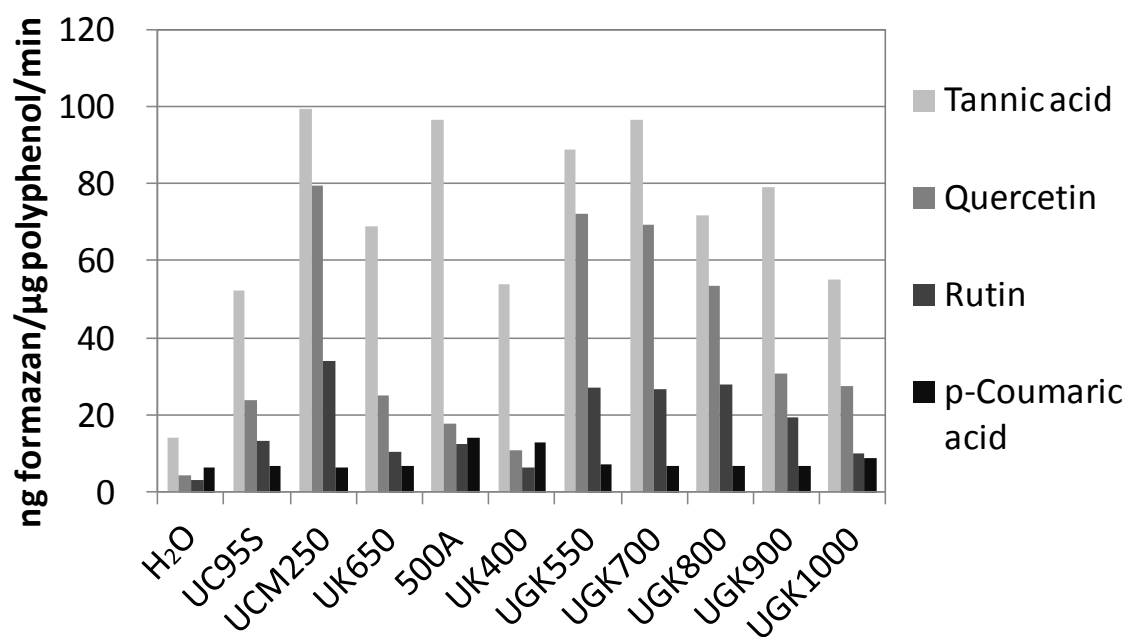


Fig. 46. *In vitro* detection of ROS in different mixtures of polyphenols and magnesium oxide nanoparticles.

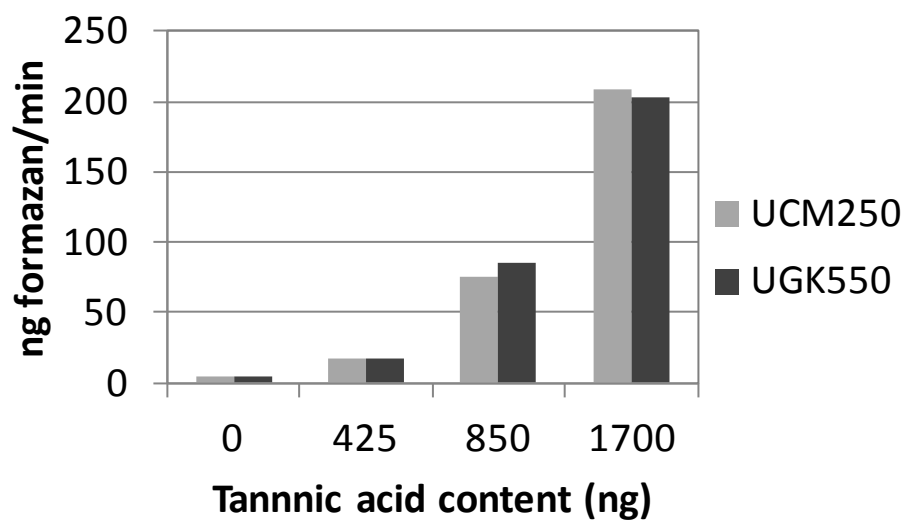


Fig. 47. Concentration-dependent polyphenol effect on ROS production in reaction with magnesium oxide nanoparticles and tannic acid.

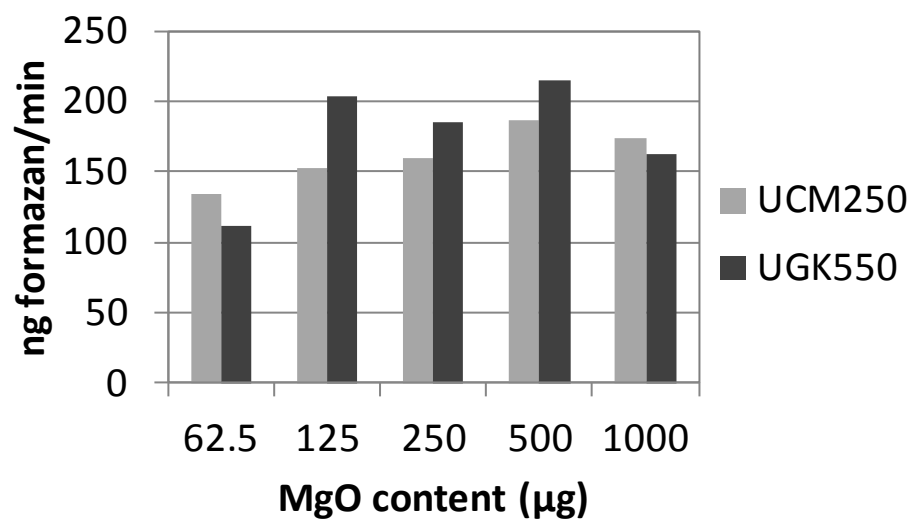


Fig. 48. No effect of magnesium oxide concentration on ROS production in reaction with magnesium oxide nanoparticles and tannic acid.

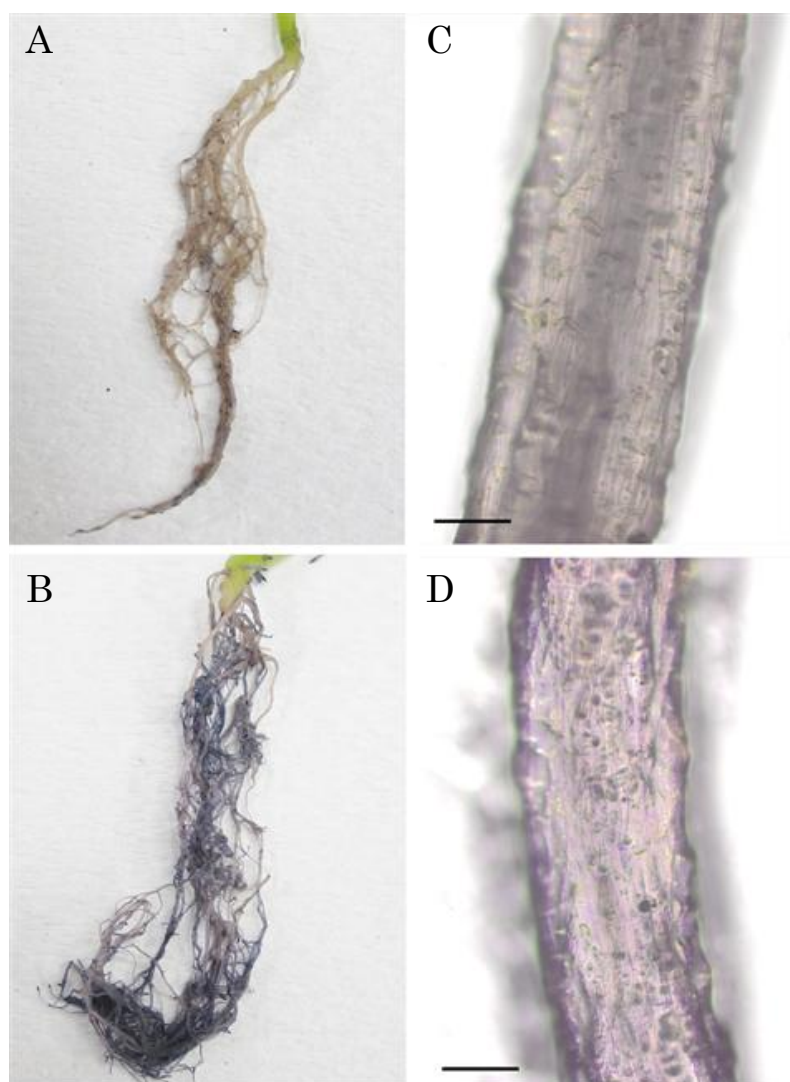


Fig. 49. *In vivo* detection of ROS generation induced by magnesium oxide nanoparticles treatment. Formazan deposition after NBT staining of tomato roots treated with distilled water (A and C) or 1% MgO NP (B and D).

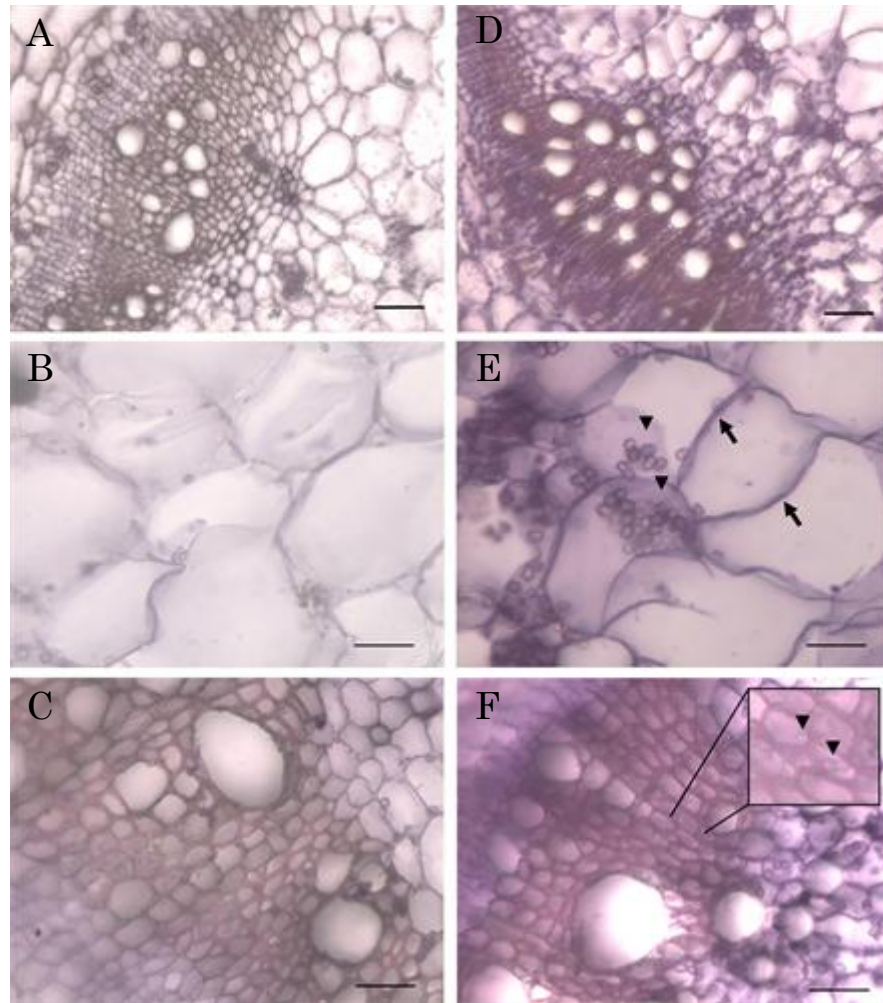


Fig. 50. Immunohistochemical detection of β -1,3-glucanase in hypocotyl tissues of tomato plants following treatment of their roots with MgO NP. β -1,3-glucanase detection in hypocotyl sections using an anti-PR-N antibody at 7 days after treating with distilled water (A, B, and C) or 0.7% MgO NP suspension (D, E, and F). The bluish-purple color signal indicates a positive PR-N signal. Light microscopic images show hypocotyl (A, D), pith (B, E), and xylem (C, F) tissues. Arrows show β -1,3-glucanase localization in the apoplast of pith tissues. Arrowheads show granular structures. Bars: A and D = 50 μ m and B, C, E and F = 100 μ m.

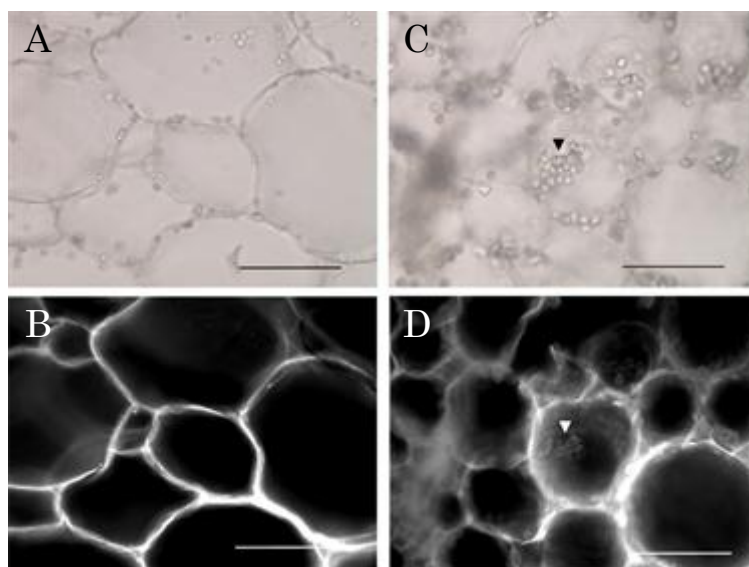


Fig. 51. Fluorescence microscope detection of tylose-like structures in hypocotyl tissues. Calcofluor stained hypocotyl tissue sections of tomato plants treated with distilled water (A and B) or 0.7% MgO NP suspension (C and D). Bright-field (A and C) and monochromatic fluorescent images (B and D) of pith tissues are shown. Arrowheads show tylose-like structures. Bars: 50 μ m.

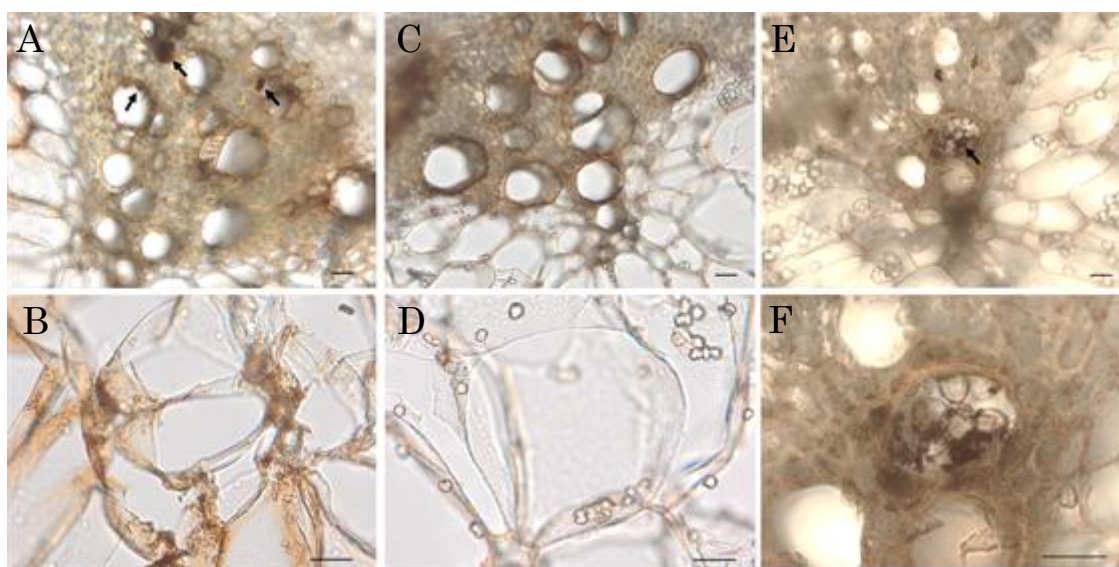


Fig. 52. Immunohistochemical detection of *Ralstonia solanacearum* in hypocotyl tissues of plants in which the roots were treated with MgO NP. *R. solanacearum* was detected in hypocotyl tissue sections using an anti-*R. solanacearum* antibody at 7 days after treating the plants with distilled water (A and B) or 0.7% MgO NP suspension (C to F). The brown signal (arrows) indicates the location of *R. solanacearum*. Bars: 20 μm .

4. 考察

本研究では、MgO ナノ粒子が植物病原細菌である *R. solanacearum* に対して *in vitro* で強い抗菌活性を有することを明らかにした。MgO ナノ粒子はグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌に対し高い抗菌活性を有する人体および環境負荷の少ない無機ナノ粒子であり、*Escherichia coli* O157:H7、*Salmonella aureus* および *Bacillus* 属といったヒト病原性細菌などに対する殺菌作用がある (Jin and He, 2011; Koper *et al.*, 2002; Sawai *et al.*, 2000)。MgO ナノ粒子の抗菌メカニズムについては不明な点が多い。ヒト病原細菌の *E. coli* および *Salmonella* に対する MgO ナノ粒子の抗菌性は、細菌の細胞膜変形および破壊による細胞内含有物の漏出に起因した細胞死によってもたらされる (Jin and He, 2011)。また、Sawai ら (2000) は *E. coli* および *S. aureus* に対する MgO ナノ粒子の抗菌性を報告しており、その抗菌活性において MgO 粒子表面に発生する ROS が重要な役割を持つことを示唆している。MgO ナノ粒子の細菌に対する抗菌性の程度は粒子のサイズおよび濃度に強く依存している (Huang *et al.*, 2005; Jin and He, 2011)。MgO を含めた金属ナノ粒子の表面積増加はナノメートルサイズの粒子表面における反応性を高め、H₂O₂ などの ROS の発生を増加させると考えられている。したがって粒子サイズと負に相関した ROS の発生が、より小さな粒子サイズを持つ MgO ナノ粒子の強い抗菌活性に密接に関わっている (Huang *et al.*, 2005; Ohira *et al.*, 2008)。一方、Leung ら (2014) らは、MgO ナノ粒子による細胞膜の破壊は ROS の発生を伴わずに起こり、pH の変化や Mg イオンの放出といった複合的な作用によって引き起こされることを報告している。ZnO や CuO のような他の酸化金属ナノ粒子の抗菌性においても、金属イオンの放出が細胞毒性に関与している (Horie *et al.*, 2012)。しかしながら、MgO は細胞毒性が低く、MgO ナノ粒子の上清や Mg イオンは *E. coli* の生存に影響を与えないことが報告されえている (Leung *et al.*, 2014)。本研究では、高濃度 (500 ppm 以上) MgO ナノ粒子を処理した際に *R. solanacearum* に対して強い抗菌活性がみられたが、一方で 100 ppm の濃度で処理した際はコントロールと比較して細菌数の増加を示した。この結果は、100 ppm では MgO 粒子濃度が殺菌には不十分で、放出された Mg イオンが逆に細菌の代謝に利用されたことを示唆している。

以上の結果から、MgO ナノ粒子はその殺菌作用により土壌病害である青枯病の

発病抑制効果を示すことを予想した。しかしながら、*R. solanacearum* 接種直後の MgO ナノ粒子処理は青枯病の発病進展の抑制効果をほとんど示さなかった。対照的に、トマトおよびシロイヌナズナの地下部への MgO ナノ粒子の前処理は、顕著に *R. solanacearum* 感染による萎凋症状を遅延させ、植物体内における細菌の増殖も抑制した。この結果は、MgO ナノ粒子がトマトの *R. solanacearum* に対する抵抗性を誘導することを示唆している。

生物・非生物ストレスのなかには、植物ホルモン依存的な抵抗性関連遺伝子発現等を介して全身的な *R. solanacearum* 抵抗性を誘導するものがある。たとえば、微生物生物防除剤として知られる *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 のトマト地下部への処理は、*R. solanacearum* 感染時における JA マーカー遺伝子 *PIN2* および ET マーカー遺伝子 *PR1b* の胚軸部への全身的な発現を誘導し、青枯病の発病を顕著に減少させる (Tan *et al.*, 2013)。シリコンの土壌処理も同様にトマト青枯病の発病を抑制する。シリコン処理したトマトでは、*R. solanacearum* 感染時に jasmonate and ethylene responsive factor 3 および 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase をコードする JA/ET マーカー遺伝子の発現が誘導される (Ghareeb *et al.*, 2011)。また、青枯病抵抗性品種の *R. solanacearum* 感染時における抵抗性応答においてもいくつかの植物ホルモン依存的なシグナル伝達が誘導される。抵抗性品種 Hawaii7996 では、*R. solanacearum* 感染時に ET 依存的 *PR* 遺伝子 (*PR1b* および *Osm*) や SA 依存的 *PR* 遺伝子 (*PR-1a* および *GluA*) の発現が活性化される (Milling *et al.*, 2011)。青枯病抵抗性トマト品種 LS-89 は、*R. solanacearum* の感染時に ET シグナル伝達および JA シグナル伝達関連遺伝子の発現を誘導する (Ishihara *et al.*, 2012)。このような抵抗性品種における *R. solanacearum* 抵抗性反応は、局所的 (根) および全身的 (胚軸) に誘導されるが、実際の萎凋症状の抑制は胚軸部の細菌コロニー形成の阻害が関係していることが報告されている (Grimault and Prior, 1993; Hikichi *et al.*, 1999)。本研究においても、MgO ナノ粒子によって青枯病の発病が抑制されたトマト胚軸部では細菌コロニーの形成が抑制されていた。

ACS および ACO は ET 生合成経路に関与する主要な酵素であり、ACS は S-adenosyl-L-methionine から ACC への反応を触媒し、ACO は ACC から ET、シアン化水素および二酸化炭素を合成する反応を触媒する (Lin *et al.*, 2009)。LS-89 トマトの胚軸部において、*R. solanacearum* 接種 1 日後に *ACS2* および *ACO1* 遺

伝子発現が誘導される (Ishihara *et al.*, 2012)。エチレンシグナル伝達に関与する *ACO1/3*、*EIN2* および *ERF3* 遺伝子のサイレンシングはトマトの *R. solanacearum* に対する量的抵抗性を減少させる。一方で、シロイヌナズナのエチレン非感受性変異体 *ein2-1* は病原性 *R. solanacearum* の感染に対して病徴の顕著な遅延を示し、エチレンシグナル伝達が *R. solanacearum* のシロイヌナズナへの感染成立において正の役割を果たすことが示唆されている (Hirsch *et al.*, 2002)。また、野生型シロイヌナズナ (エコタイプ col-0) において JA/ET 誘導性の *PR3* および *PR4* はシロイヌナズナの根への感染 2 日後以降に発現が誘導され、接種 6 日以降に強く発現する (Hirsch *et al.*, 2002)。本研究では、MgO ナノ粒子で処理したトマトの根および胚軸において ET 依存的な *Osm* 遺伝子の発現が増加することを明らかにした。しかしながら、エチレン非応答性の変異体 *etr1-1* においても、MgO ナノ粒子前処理による青枯病の病徴進展抑制効果が確認された。これらの結果は、MgO ナノ粒子処理はトマトにエチレン生産を誘導するものの、エチレンがなくても MgO ナノ粒子処理による青枯病抑制作用は生じることを示唆している。

LS-89 トマトの *R. solanacearum* の感染時におけるトランスクリプトーム解析により、抵抗性反応における JA シグナル伝達の活性化が示されている (Ishihara *et al.*, 2012)。LS-89 トマトへの *R. solanacearum* 感染時 (接種 1 日後)、*A. thaliana* の *FAD2* ホモログの発現が増加する。*FAD2* はリノレン酸生合成を触媒する脂質不飽和化酵素であり、本酵素によって生じたリノレン酸はその後リポキシゲナーゼを介して JA 前駆体であるヒドロペルオキシド体に変換される (Robert-Seilanianantz *et al.*, 2007)。MgO ナノ粒子を処理したシロイヌナズナの根において *Thi2.1* 遺伝子の発現が誘導された。*Thi2.1* は傷害、JA および病原菌の感染などに応答して発現誘導され (Bohlmann *et al.*, 1998)、*F. oxysporum* f. sp. *matthiolae* といった多くの病原菌に対する抵抗性に関与している (Epple *et al.*, 1998)。青枯病感受性トマトへのシロイヌナズナ *Thi2.1* 遺伝子の導入は、萎凋症状を顕著に減少させる (Bohlmann *et al.*, 1998)。本研究では、MgO ナノ粒子で処理したトマトの根および胚軸において、JA 依存的な *LoxA* および *PIN2* 遺伝子の発現が増加することを明らかにした。しかしながら、ジャスモン酸生合成能の低下したシロイヌナズナ変異体 *fad3-2* および *fad7-1,8* を用いた実験において、MgO ナノ粒子前処理による病徴進展の抑制効果が確認された。これらの結果は、MgO ナノ粒子処理はトマトにジャスモン酸生産を誘導するものの、ジャスモン酸がなくても MgO ナノ粒子処

理による青枯病抑制作用は生じることを示唆している。

植物の重要な細胞内シグナル因子である SA やオーキシンは、トマトおよびシロイヌナズナの *R. solanacearum* に対する量的抵抗性において重要な役割を果たしている。青枯病抵抗性トマト品種 Hawaii7996 では、*R. solanacearum* 感染時に SA 依存的 *PR* 遺伝子 (*PR-1a* および *GluA*) の発現が活性化される (Milling *et al.*, 2011)。また、Hawaii 7996 品種の SA シグナル伝達に参与する *NPR1*、*TGA2.2* および *TGA1a* 遺伝子のサイレンシングは *R. solanacearum* に対する抵抗性を著しく低下させる (Chen *et al.*, 2009)。SA アナログの Benzothiadiazole はオーキシンの認識、輸送およびシグナル伝達に参与する遺伝子の発現を抑制する (Wang *et al.*, 2007)。オーキシンは植物体内において、トリプトファン代謝を介して合成される (Mano and Nemoto, 2012)。WAT1 は液胞膜局在性のインドール酢酸 (オーキシン) トランスポーターをコードし (Ranocha *et al.*, 2010)、*wat1* 変異体は、細胞伸長の減少、細胞壁の構造的な変化および二次細胞壁厚の減少といった細胞壁修飾に関する変化に関わる表現型を示す (Ranocha *et al.*, 2010)。シロイヌナズナの *wat1* 変異体は *R. solanacearum* に対して顕著な抵抗性を示す (Denancé *et al.*, 2013a)。近年、Denancé ら (2013a) は *wat1* 変異体の *R. solanacearum* 抵抗性はトリプトファン・インドールグルコシノレート (Trp/IGS) 生合成経路の遺伝子発現変化が重要な役割を果たすことを報告している。*wat1* 変異体の根では、トリプトファン生合成の上流で働く 2-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (*DAHP*) synthase (*DHS1*) および anthranilate synthase (*ASA1*) と同様に、トリプトファン代謝に参与する酵素遺伝子の調節因子である *ATR1* (altered tryptophan regulation 1) の発現が野生型と比較して減少する (Denancé *et al.*, 2013a)。Indole glucosinolate は Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate の媒介を受け、トリプトファン代謝の下流で生合成される。adenosine-5'-phosphosulfate kinase (AKN2) は Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate 生合成を触媒する酵素であり、*wat1* 変異により根での遺伝子発現量が低下する (Denancé *et al.*, 2013a)。本研究では、MgO ナノ粒子を処理したシロイヌナズナの根においていくつかの Trp/IGS 生合成関連遺伝子が発現変動を示すことを明らかにした。MgO ナノ粒子処理によって *ATR1* は発現量の減少を示した一方で、*ASA1* および *DHS1* の発現は増加を示した。SA は *wat1* 変異体の *R. solanacearum* に対する抵抗性に深く関与しており、サリチル酸分解酵素 (NahG) の導入は *wat1* 変異体における抵抗性を著しく損なわせ

る (Denancé *et al.*, 2013a)。本研究では、シロイヌナズナの SA 生合成欠損変異体 *sid2-2* および NahG トマトへの MgO ナノ粒子処理は *R. solanacearum* に対する抵抗性の誘導作用を示さなかった。これらの結果は、MgO ナノ粒子誘導抵抗性においては SA 生合成が必須要素であることを示唆しており、青枯病抵抗性品種や *wat1* 欠損体の抵抗性と類似したシグナル伝達反応によって抵抗応答が誘導されていることを示唆している。

アブシジン酸 (ABA) もまた、シロイヌナズナの *R. solanacearum* に対する抵抗性において重要な役割を果たしており、ABA 非感受性の *abi1-1* および *abi2-1* 変異体は *R. solanacearum* に対する感受性が顕著に増大する (Hernández-Blanco *et al.*, 2007)。シロイヌナズナの *R. solanacearum* 感受性 Col-5 と抵抗性遺伝子 RRS1-R を持つ Nd-1 との *R. solanacearum* 感染時における発現遺伝子の網羅的解析は、Nd-1 への接種 4 - 5 日後における ABA シグナル伝達に関与する遺伝子の発現増加を明らかにしている (Hu *et al.*, 2008)。さらに近年、Feng ら (2012) はシロイヌナズナにおける *R. solanacearum* 感染の微生物的コントロールにおいて ABA シグナル伝達が主要な因子であることを明らかにしている。本研究においても、MgO ナノ粒子で処理したシロイヌナズナにおいて、アブシジン酸シグナル伝達に関与する *ABF1* の発現の増加が確認された。

本研究から、MgO ナノ粒子で処理したトマトにおいて、SA、JA、ET およびオーキシシンシグナル伝達に関係する遺伝子が局所的、全身的に発現誘導されることが明らかになった。このような遺伝子発現の誘導パターンは、生物農薬やシリコンで処理したトマトや、青枯病抵抗性トマト品種に *R. solanacearum* を接種した際に見られる抵抗性と類似している。しかしながら、MgO ナノ粒子誘導抵抗性においては、*R. solanacearum* の感染がなくても SA、JA、ET およびオーキシシンシグナル伝達に関係する遺伝子の発現が誘導されるという特徴があり、*R. solanacearum* が感染するとさらに強い抵抗性反応が誘導された。また、これらの遺伝子の発現パターンもこれまで知られているストレス誘導抵抗性とは異なっていた。

本研究では、MgO ナノ粒子がトマトの根および培養細胞内に迅速な ROS 蓄積を誘導することを明らかにした。また、 $O_2^{\cdot -}$ 発生が MgO ナノ粒子と植物成分であるポリフェノールとの反応によって引き起こされることを明らかにした。MgO ナノ粒子表面では OH^{\cdot} や $O_2^{\cdot -}$ が発生する (Sawai *et al.*, 2000)。しかしながら、本研

究で用いた MgO ナノ粒子の懸濁液における ROS の検出を試みたが、 $O_2^{\cdot-}$ および H_2O_2 の発生は確認されなかった。ポリフェノールは ROS を除去する抗酸化成分として良く知られている一方で、求電子剤としてラジカルを発生させる prooxidant としても働く (Sakihama *et al.*, 2002)。また、固体塩基触媒である MgO ナノ粒子は脱プロトン反応（水素原子の引き抜き）を触媒する作用がある (Lamb *et al.*, 1988)。したがって、MgO ナノ粒子を処理したトマトの根における $O_2^{\cdot-}$ 発生は、フェノール分子に含まれる水酸基の引き抜きによって発生したポリフェノールラジカルに起因すると推察される。

MgO ナノ粒子はまた、トマト培養細胞内の迅速な ROS および NO の発生を引き起こし、細胞死を誘導する。MgO ナノ粒子による培養細胞内の ROS 発生は、 $O_2^{\cdot-}$ 除去剤、NADPH オキシダーゼ阻害剤、 Ca^{2+} イオンキレート剤、および細胞内 Ca^{2+} 遊離抑制剤の処理によって顕著な抑制がみられた。植物や哺乳類細胞において、細胞内の Ca^{2+} 濃度増加とそれに伴う NADPH オキシダーゼの活性化は細胞内 ROS 濃度を増加させ、細胞死を誘導する (Foreman *et al.*, 2003; Mattson and Chan, 2003; Sagi and Fluhr, 2006)。in vivo および in vitro での MgO ナノ粒子誘導性 ROS 発生の調査から、MgO ナノ粒子処理によってトマトの根で発生する $O_2^{\cdot-}$ は、根に含まれるポリフェノール成分と MgO ナノ粒子との反応で生成した ROS に加え、細胞内 Ca^{2+} の放出に起因した NADPH オキシダーゼの活性化によるものであることが示唆される。一般に、急激な ROS の発生は植物の病原菌感染時における抵抗性反応で見られる現象で、*R. solanacearum* 感染後のトマトの青枯病抵抗性品種 BT-10 においても報告されている (Mandal *et al.*, 2011)。このようなことから、MgO ナノ粒子を処理した根において生じる迅速な $O_2^{\cdot-}$ 蓄積が、抵抗性品種における *R. solanacearum* に対する応答と類似した抵抗性反応を誘導している可能性が推察される。

R. solanacearum は感染したトマトの胚軸部において、導管部や木部付随柔細胞の細胞間隙にコロニー形成を行う。Ishihara ら (2012) は青枯病抵抗性トマト品種 LS-89 において、 β -1,3-glucanase が感受性品種の *R. solanacearum* コロニー形成部位（木部組織および木部付随柔細胞間隙）の周囲に蓄積することを報告し、 β -1,3-glucanase 蓄積が関与する防御応答が木部導管組織からの *R. solanacearum* の増殖および蔓延を防ぐ重要な役割を果たしていることを推察している。本研究においても、トマトの根への MgO ナノ粒子処理によって、胚軸部の木部組織および

木部柔組織における全身的な β -1,3-glucanase 蓄積の誘導が観察された。この結果も、*R. solanacearum* に対する MgO ナノ粒子誘導抵抗性が、LS-89 の青枯病抵抗性と類似した抵抗性であることを示唆している。

本研究ではまた、MgO ナノ粒子処理したトマト胚軸部において、木部組織や木部付随柔細胞内にチロースが蓄積することを明らかにした。チロースは病原菌の導管付随柔細胞の代謝活性化によって形成されるバブル状の構造物として知られ、壁孔を通した突出により木部組織内に蓄積し、病原菌の蔓延を阻害する (Grimault *et al.*, 1994; Talboys, 1972)。チロース形成は *F. oxysporum*, *Verticillium albo-atrum* および *R. solanacearum* といった主要な導管病の病原菌に対する共通の抵抗性反応である (Hutson and Smith, 1980; Rahman *et al.*, 1999)。青枯病抵抗性品種 Caraïbo において、チロースは *R. solanacearum* に応答して蓄積し、コロニー形成された木部導管を閉塞させる (Grimault *et al.*, 1994)。したがって、MgO ナノ粒子処理したトマト胚軸組織内の木部および木部付随柔細胞に蓄積したチロースが、*R. solanacearum* に対する MgO ナノ粒子誘導抵抗性において重要な働きを担っていることが示唆される。チロース蓄積におけるオーキシン (Buddenhagen and Kelman, 1964; Sequeira, 1965)、ET (Sun *et al.*, 2007) および病原菌由来の何らかの生体分子の関与が示唆されている。しかしながら、植物の細胞内チロース形成を誘導する分子機構については不明な点が多く、今後さらに詳細な調査が必要である。

本研究では、MgO ナノ粒子が感受性品種桃太郎の根および胚軸部において *R. solanacearum* 抵抗反応を誘導し、青枯病の発病進展を顕著に抑制することを明らかにした。この青枯病抵抗性には、植物ホルモン(SA、JA、ET およびオーキシン)のシグナル伝達が関与し、胚軸組織に β -1,3-glucanase およびチロースの蓄積が誘導される。MgO ナノ粒子が誘導する *R. solanacearum* 抵抗反応には、MgO ナノ粒子処理したトマトの根における迅速な ROS 蓄積の蓄積が必須要素と考えられる。このような性質を持った物質はこれまでほとんど知られていない。MgO ナノ粒子は、人体および環境への負荷が小さく、製造コストも安価であることから、青枯病の防除剤として大きなポテンシャルを有していると思われる。しかしながら、MgO ナノ粒子による青枯病抵抗性の誘導メカニズムにはまだ不明な点が多く、さらなる解析が必要である。また、MgO ナノ粒子を実用化するためには、圃場での効果試験やトマト品種間による抵抗性の差異などのデータを蓄積する必要がある。

第3章 帯電微粒子水による植物病害抑制

1. 序論

Botrytis cinerea Pers. Fr. (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) は、世界中で 200 種以上の作物に感染し、灰色かび病を引き起こすネクロトロフィックの病原菌である。本菌は主に施設栽培やポストハーベットの貯蔵中において果実、野菜類、および花卉類に感染する (Elad and Shtienberg, 1995; Williamson *et al.*, 2007)。現在までに灰色かび病の防除には化学合成農薬が広く用いられてきたが、本菌はライフサイクルが短く、かつ孢子を多数産生することから、薬剤耐性菌が出現しやすい (Leroux *et al.*, 2002)。そのため、灰色かび病を制御する新規の防除技術が常に望まれている。

水に高電圧掛けることにより発生する静電霧化微粒子水 (electrostatic atomized water particles; EAWP) は毛細管現象で吸い上げられたセラミック製の負電極先端の水が対極との静電気力により飛びだし、Rayleigh (レイリー) 分裂によりさらに微細化されることによって広範囲に拡散される直径数 nm の微粒子水である (Mori and Fukumoto, 2002)。他の噴霧化技術によって生成されたものと比較して、EAWP は電界の印加による粒子水の扱い易さ、同極性という性質による微粒子同士の結合の回避および狭い粒径分布といった多くの優位性がある (Watanabe *et al.*, 2003)。EAWP はその微粒子水中に $O_2^{\cdot -}$ 、 $OH^{\cdot -}$ および過酸化水素といった活性酸素種 (ROS) のほかに、一酸化窒素 (NO) や硝酸および亜硝酸イオンを含んでおり (Shimokage *et al.*, 2005; Yamauchi *et al.*, 2007; Yamauchi *et al.*, 2014)、抗ウイルス活性および細菌の増殖抑制作用が報告されている (Asano *et al.*, 2010)。

B. cinerea のようなネクロトロフィック病原菌に対する植物の防御機構は非常に複雑であり、これまでに多くの研究がなされているにも関わらず、その生化学的および分子生物学的理解はあまり進んでいない。しかしながら、近年 ROS および NO が植物免疫機構の様々な場面で重要な役割を果たしていることがわかり (Delledonne *et al.*, 1998; Scheler *et al.*, 2013)、これらが *B. cinerea* に対するトマト培養細胞の抵抗性誘導において初期シグナルとして重要な役割を果たしていることが明らかになった (Pietrowska *et al.*, 2014)。KulyeMahesh ら (2012) は、ネクロトロフィック病原菌に対する抵抗性における NO および ROS の役割に関す

るモデルを提唱している。それによると、植物組織における NO バーストは *B. cinerea* を含めたネクロトロフィック病原菌に対する抵抗性に重要な役割を果たすが、ROS バーストはネクロトロフィック病原菌の病斑を拡大させ、抵抗性を負に制御する。

NO は細胞内の酸化還元調節因子として重要なシグナル分子である。植物において NO は主に NO 合成酵素 (NOS) (Wendehenne *et al.*, 2003) および硝酸還元酵素 (NR) (Desikan *et al.*, 2002) によって合成される。NOS は L-アルギニンから L-シトルリンおよび NO への酸化反応を触媒し、NR は主に亜硝酸イオンから NO への還元反応を触媒する (Yamasaki and Sakihama, 2000)。NR はシロイヌナズナにおける NO のソースとして初めに同定され (Desikan *et al.*, 2002)、他の植物種においても多数のホモログが確認されている (Meyer *et al.*, 2005)。NO は、タンパク質のシステインチオール基を修飾 (S-ニトロシル化) して S-ニトロソチオール (SNO) を形成する (Lindermayr and Durner, 2009)。この可逆的なタンパク質修飾は、多くの生理的な応答に関与しており、タンパク質の局在や、タンパク質-タンパク質相互作用の調節を通じて植物の免疫応答を制御している (Wang *et al.*, 2009; Yun *et al.*, 2011; Bykova and Rampitsch, 2013)。また、細胞内の SNO は SA 蓄積 (Loake and Grant, 2007) およびサリチル酸依存的遺伝子発現にも関与している (Feechan *et al.*, 2005)。

本研究では、EAWP が含有する NO および ROS がトマトにおいて *B. cinerea* に対する抵抗性を誘導するという仮説を立て、これを検証するための実験を行った。

2. 材料および方法

1. 供試植物

供試植物として、トマト (*Solanum lycopersicum* L.) の桃太郎品種、SA 分解酵素導入変異体 (NahG) およびその野生型である Moneymaker 品種を用いた。トマトの生育は上記 (第 2 章) と同様に行った。また、特に記述がない場合は桃太郎を実験に用いた。

2. 供試菌

供試菌として *B. cinerea* N-2 株を用いた。胞子の回収および接種は上記 (第 2 章) と同様に行った。

3. 静電霧化微粒子水 (EAWP)

EAWP を発生する帯電微粒子水発生装置は小型のファン (2.5×2.5 cm) と、その反対側にポリエステルホース (1.5 cm diameter) を付属したプラスチックケース ($20 \times 14 \times 5$ cm) 内に設置した。全ての実験は、小型ビニール温室 (W70×D50×H160cm) 内に帯電微粒子水発生装置を設置して行った (Fig. 53)。また帯電微粒子水処理装置は設置前に放出される H_2O_2 を Yamauchi ら (2014) の方法で測定し、電圧調整やタイマーを用いて処理時間を変えることにより植物に噴霧される H_2O_2 処理濃度を調節した。また各実験のコントロールとして帯電微粒子水発生装置を設置していない帯電微粒子水処理装置 (対象装置) を用意した。

4. EAWP 処理によるトマト灰色かび病発病抑制作用

30 日間生育したトマトの本葉第 3 葉に EAWP を $66 \text{ ngH}_2\text{O}_2/\text{cm}^3/\text{h}$ の濃度で 1 週間処理した後、本葉第 3 葉の各副葉に *B. cinerea* 胞子懸濁液 (1×10^6 個/ml) を $5 \mu\text{l}$ ずつ接種した後、 25°C 、過湿条件で静置した。接種 3 日後に病斑直径を計測し、ラクトフェノールコットンブルー染色によりトマト葉上における *B. cinerea* コロニーを顕微鏡で観察した。組織の固定および染色は上記 (第 1 章) のように行った。

5. 細胞内の NO 生合成および酸化還元電位の調節に関与する遺伝子の発現解析

30 日間生育したトマトの本葉第 3 葉に EAWP を 9、23 および $66 \text{ ng H}_2\text{O}_2/\text{cm}^3/\text{h}$

の濃度で 1 週間処理した後に各副葉を回収し、液体窒素で凍結させた後 - 80℃で保存した。トマトの NO 生合成に関与する *NOS* および *NR* 遺伝子発現は、 $\Delta\Delta C_T$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001) を用いたリアルタイム PCR によって解析した。トマトの Nitrate reductase (*NR*, HQ616893), Nitric oxide synthase 1 (*NOS1*, DQ539436) glutathione peroxidase (*GPx*, Y14762), thioredoxin peroxidase 1 (*TPx1*, AY281152), thioredoxin (*Trx*, AF261142) および Actin (FJ532351) の遺伝子配列からプライマーを設計した (Table 7)。RNA の抽出、cDNA の合成およびリアルタイム PCR は上記 (第 2 章) と同様の方法で行った。

6. トマト葉内 NO 蓄積の検出

トマト葉内の NO 蓄積は DAF-2DA (Daichi Pure Chemicals) を用いて検出した。30 日間生育したトマトの本葉第 3 葉に EAWP を 66 ng H₂O₂/cm³/h の濃度で 1 週間処理した後、組織の一部 (約 1 × 1 mm) を速やかに 25 μM DAF-2DA 溶液 (20 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解) 中に浸漬し、針を除いたシリンジを用いて溶液を組織内に浸透させた。室温、暗黒下で 30 分間インキュベートした後、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; BIORIVO, Keyence) を用いて蛍光発生を観察した。NO 依存的な緑色蛍光は GFP-BP (励起波長 470/40、吸収波長 535/50) BZ フィルタを用いて検出した。

7. トマト葉内 S-ニトロシル化タンパク質の検出

ニトロシル化タンパク質の検出は、S-ニトロシル化システインをビオチン修飾システインに変換するビオチンスイッチ法を用いて行った (Kunciewicz *et al.*, 2003; Lindermayr *et al.*, 2005)。30 日間生育したトマトの本葉第 3 葉に EAWP を 66 ng H₂O₂/cm³/h の濃度で 3 日間処理した後、副葉を回収し、液体窒素で凍結させた後 - 80℃で保存した。回収したトマト葉のタンパク質を抽出し、ビオチンスイッチ法による S-ニトロシルタンパク質のビオチン修飾を行った。すなわち、サンプル 0.3g を液体窒素で冷却した乳鉢中で磨砕し、MAE buffer (HEPES 25 mM、EDTA 25 mM、Triton X-100 0.2% および Protease inhibitor cocktail; pH 7.7) を 500 μl 加えてさらに磨砕した後、12,000 × g、4℃で 10 分間遠心した。回収した上清に MMTS (Methyl methanethiosulfonate; Thermo) を 0.95 μl、10% SDS 溶液を 167 μl 加えて 50℃で 30 分間インキュベートした。2 倍量の氷冷アセトンを加えて - 20℃で 1

時間インキュベートした後、 $5,000\times g$ 、 4°C で10分間遠心し、ペレットを100 μl のRB buffer (HEPES 25 mM、EDTA 1 mM、SDS 1%; pH 7.7) で溶解した。溶解したタンパク質に4 mM Biotin-HPDP (Thermo) 溶液を33 μl 、20 mMのアスコルビン酸溶液を6.7 μl 加え、室温で1時間インキュベートした。2倍量の氷冷アセトンを加えて -20°C で1時間インキュベートした後、 $5,000\times g$ 、 4°C で10分間遠心し、ペレットを100 μl のMAE bufferで溶解した。ビオチン修飾されたタンパク質は12.5%のポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEによって分離した(Laemmli, 1970)。クマシーブリリアントブルー染色は20 μg のタンパク質を用いて行い、電気泳動後のゲルを0.1%のクマシーブルーを含有する7%酢酸・50%メタノール溶液で染色した。ウェスタンブロッティングでは500 ngのタンパク質を電気泳動後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した後4%のウシ血清アルブミンで1時間ブロッキングを行った。TBSTで3回洗浄した後、抗ビオチン抗体(1:10,000, 10006524-1; Cayman Chemical)を30分間処理し、さらにTBSTで3回洗浄した。ビオチン化タンパク質の検出は、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare)を用い、プロトコールに従った。

8. 抵抗性関連遺伝子発現の解析

30日間生育したトマトの本葉第3葉にEAWPを66 ng $\text{H}_2\text{O}_2/\text{cm}^3/\text{h}$ の濃度で1週間処理した後に各副葉を回収し、液体窒素で凍結させた後 -80°C で保存した。また、EAWPを前処理したトマトへの*B. cinerea*感染時における抵抗性関連遺伝子発現を明らかにするため、桃太郎およびMoneymaker(野生型およびNahG)にEAWPを66 ng $\text{H}_2\text{O}_2/\text{cm}^3/\text{h}$ の濃度で1週間処理した後、本葉第3葉の各副葉に*B. cinerea* 孢子懸濁液 (1×10^6 個/ml)を5 μl ずつ接種した後、 25°C 、過湿条件で静置した。桃太郎の葉は接種1、3および6時間後に回収し、Moneymaker(野生型およびNahG)の葉は接種3時間後に回収した。トマトのchitinase 3 (*CHI3*, Z15141), chitinase 9 (*CHI9*, Z15140), β -1,3-glucanase A (*GLUA*, M80604), β -1,3-glucanase B (*GLUB*, M80608) およびActin (FJ532351) の遺伝子配列からプライマーを設計し (Table 8)、リアルタイムPCRを行った。RNAの抽出、cDNAの合成およびリアルタイムPCRは上記(第2章)と同様の方法で行った。

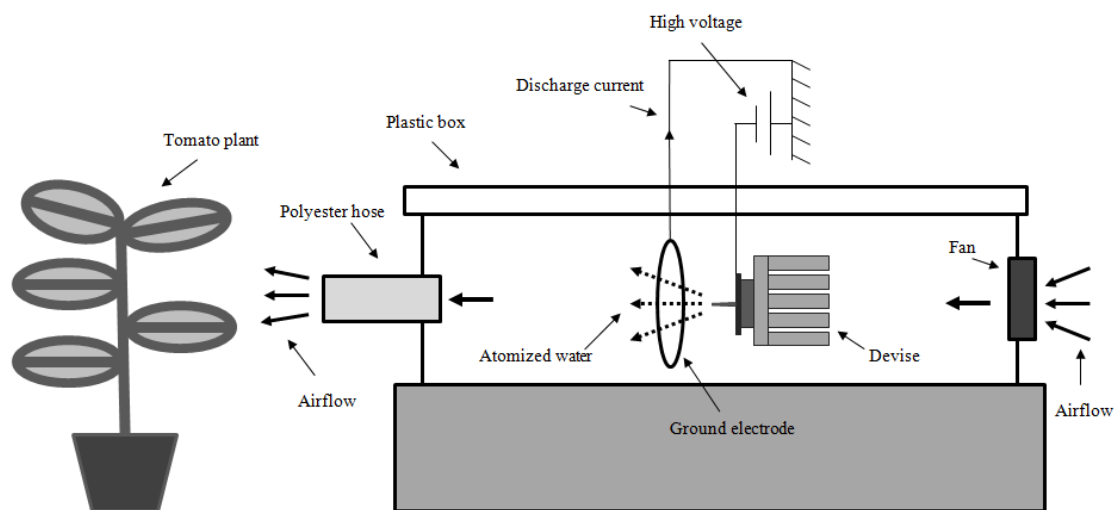


Fig. 53. A sketch of the apparatus used to generate regulated air flow containing electrostatic atomized water particles.

Table 7. Oligonucleotide primers for analyzing the NO synsesis and redox-related gene expression in tomato.

Taget gene	Primer pair	Accession No.	Sequence (5'-3')
NR	SlNR-F	HQ616893	CACCCAGAGAAGCCAACAAAG
	SlNR-R		AGCAAGTCAAGCACCTCAACCT
NOS1	SlNOS1-F	DQ539436	TGACCAGGAGACATACGAGTTGA
	SlNOS1-R		ACGACACCGTCCACAAAGAAT
GPx	SlGPx-F	Y14762	CATTGAAGATATCCAGCAAATGGT
	SlGPx-R		CCATTCACGTCAACCTTGTCA
TPx1	SlTPx1-F	AY281152	AGCATGTGCCTGGCTTTATTG
	SlTPx1-R		TTTTGCCCAGGCCTTCATC
Trx	SlTrx-F	AF261142	AGGGCTCATCCCGATACAAA
	SlTrx-R		AGCAAAGAGCAATGGATTCCA
Actin	SlAct-F	FJ532351	TGTCCCTATCTACGAGGGTTATGC
	SlAct-R		CAGTTAAATCACGACCAGCAAGA

Table 8. Oligonucleotide primers for analyzing the defense-related gene expression in tomato.

Taget gene	Primer pair	Accession No.	Sequence (5'-3')
PR1	SlPR1-F	M69247	TGTTGTTTCCCTTTGATGTTGCT
	SlPR1-R		AACCTAAGCCACGATACCATGAA
CHI3	SlCHI3-F	Z15141	ACCCGTTGCACTGTCTTGTCT
	SlCHI3-R		AATGGAACCGGCATTTTGTG
CHI9	SlCHI9-F	Z15140	GCGCTGACCAAGCAGCTAAT
	SlCHI9-R		TCCAGGCCACCATTGATGAT
GLUA	SlGLUA-F	M80604	TTTTGGCCATGCTGATGATAAT
	SlGLUA-R		TGCATCGTTTAGCCCTTGTTG
GLUB	SlGLUB-F	M80608	TCGCCACCAACATTCACATAA
	SlGLUB-R		GGCAAGTTGTTCCCCATCAT
Actin	SlAct-F	FJ532351	TGTCCCTATCTACGAGGGTTATGC
	SlAct-R		CAGTTAAATCACGACCAGCAAGA

3. 結果

3 - 1. EAWP のトマト灰色かび病発病抑制作用

EAWP の前処理は、コントロールと比較して、*B. cinerea* 接種 72 時間後における病斑の進展を顕著に阻害した (Fig. 54)。また、EAWP を前処理したトマトの葉では菌糸発達の顕著な阻害と、*B. cinerea* 侵入部位周辺に存在する表皮細胞の褐変を示した (Fig. 55)。本実験における EAWP 前処理は接種前の 7 日間のみ行い、接種後は行っていない。また、EAWP 処理 (66 ngH₂O₂/cm³/h) は PDA 上における *B. cinerea* の生育に影響を及ぼさない (データ未記載)。これらの結果は、EAWP がトマトの葉に *B. cinerea* に対する抵抗性を誘導することを示唆している。

3 - 2. EAWP 処理によるトマト葉内 NR 遺伝子発現の増加

EAWP はその成分として ROS、NO、硝酸イオンおよび亜硝酸イオンを含んでいるため、これら分子はトマトの細胞に直接作用し、細胞内の酸化還元状態の変化や NO 生合成に関わる遺伝子の発現に影響を与えている可能性がある。ROS の影響を見るために、植物細胞内の主要な ROS 除去タンパク質および酵素である GPx、Trx および TPx の遺伝子の発現を調べたが、7 日間の EAWP 処理による変化はなかった (データ未記載)。対照的に、植物の NO 生合成に関与する NR は全ての濃度の EAWP 処理によって発現が増加した。NOS1 については EAWP 処理による発現変化はなかった (Fig. 56)。これらの結果は、EAWP 処理はトマト葉内における NR を介した NO 合成を活性化することを示唆している。

3 - 3. EAWP 処理によるトマト葉内 NO および S-ニトロシル化タンパク質の増加

EAWP 処理によるトマト葉内の NO 蓄積を、NO 感受性の蛍光色素 DAF-2DA を用いて調べた。コントロールと比較して、EAWP 処理はトマト葉の細胞内における顕著な緑色蛍光の増加を示し、EAWP はトマト葉内に NO 蓄積を誘導することが明らかになった (Fig. 57)。またこの際、EAWP を 7 日間処理したトマト葉内細胞における自家蛍光は観察されなかったことから (データ未記載)、DAF-2DA 由来の蛍光増加が EAWP 処理によってもたらされたことが示唆された。

本研究ではさらにビオチンスイッチ法を用いて、EAWP がトマト葉細胞内における SNO タンパク質含量を増加させるかどうか調べた。特に 66 ng H₂O₂/cm³/h

といった高濃度の EAWP を処理した場合にビオチン化したタンパク質バンドの量や強度の増加を示した (Fig. 58)。

以上の結果は、EAWP がトマト葉内の SNO タンパク質含量を増加させることを示唆している。

3 - 4. EAWP 前処理トマトへの *B. cinerea* 感染時における SA 依存的 PR 遺伝子の迅速な発現誘導

NO および SNO タンパク質の増加は *PR* 遺伝子の発現など、植物の病原菌への抵抗性反応において重要な役割を果たしている (Feechan *et al.*, 2005; Loake and Grant, 2007)。したがって、本研究では EAWP がトマトの葉における *PR* 遺伝子発現を誘導するかどうか調べた。7 日間の EAWP 処理は、高濃度 (66 ng H₂O₂/cm³/h) で処理した際においてもトマトの葉に *PR* 遺伝子 (*CHI3*, *CHI9*, *GLUA*, and *GLUB*) の発現を誘導しなかった (データ未記載)。次に、EAWP 前処理トマトへの *B. cinerea* 感染初期 (接種 1 - 6 時間後) における *PR* 遺伝子発現を調べた。その結果、EAWP を前処理したトマトにおいて、*CHI3* および *GLUA* 遺伝子は *B. cinerea* 感染後に迅速な発現増加を示した (Fig. 59)。この際に、*CHI3* は接種 1 時間後および 3 時間後に発現増加を示し、*GLUA* は接種 3 時間後および 6 時間後に発現増加した (Fig. 59)。一方、EAWP の無処理トマトに *B. cinerea* を接種した際には、接種 6 時間後において *CHI3* および *GLUA* 遺伝子の発現が顕著に増加した (Fig. 59)。*CHI9* および *GLUB* 遺伝子発現の変動はほとんど見られなかった。

EAWP 前処理トマトへの *B. cinerea* 感染後の迅速な *PR* 遺伝子発現誘導作用における SA の役割を明らかにするため、SA 分解酵素を導入した NahG トマトを用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、EAWP を前処理したトマト葉における *B. cinerea* 接種 3 時間後の *CHI3* 遺伝子発現の誘導が WT で見られた一方で、NahG トマトでは見られなかった (Fig. 60)。

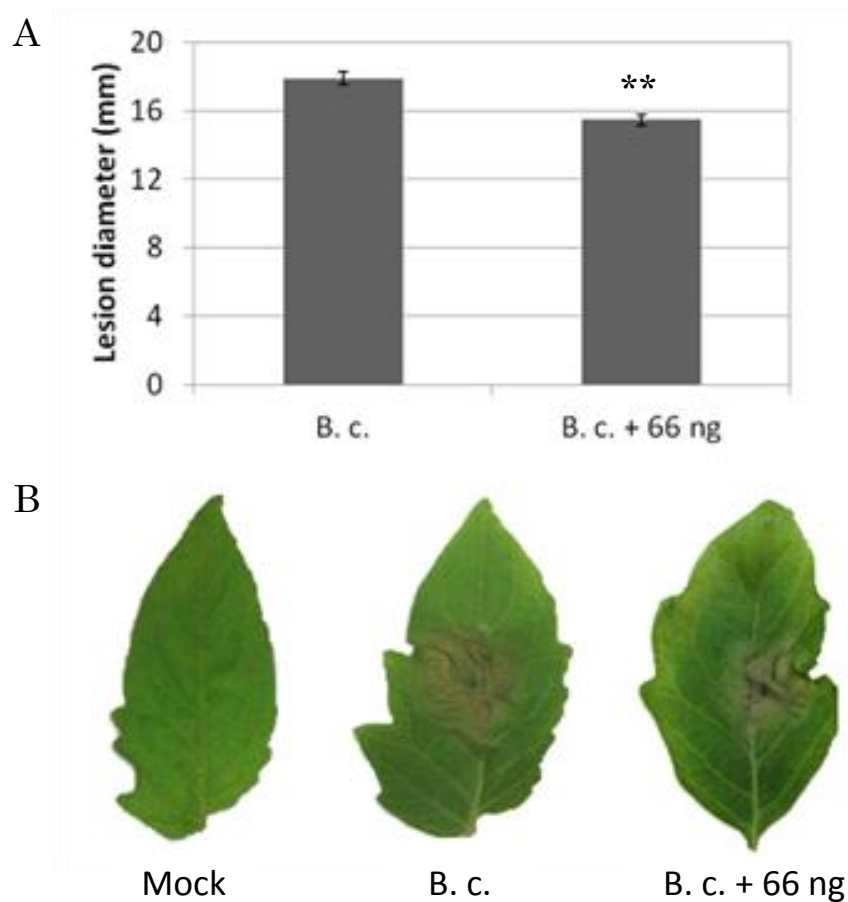


Fig. 54. The effect of electrostatic atomized water particles on gray mold development in tomato leaves. (A) Lesion diameter at 3 days post-inoculation (dpi); (B) gray mold on tomato leaves at 3 dpi. Error bars represent the standard errors ($n = 42$) from three independent experiments with five plants for each treatment. At least two compound leaves from the third true leaf of each of the tomato plants were examined. Data sets marked with asterisks are significantly different from inoculated plants with no EAWP treatment (B. c.), as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$.

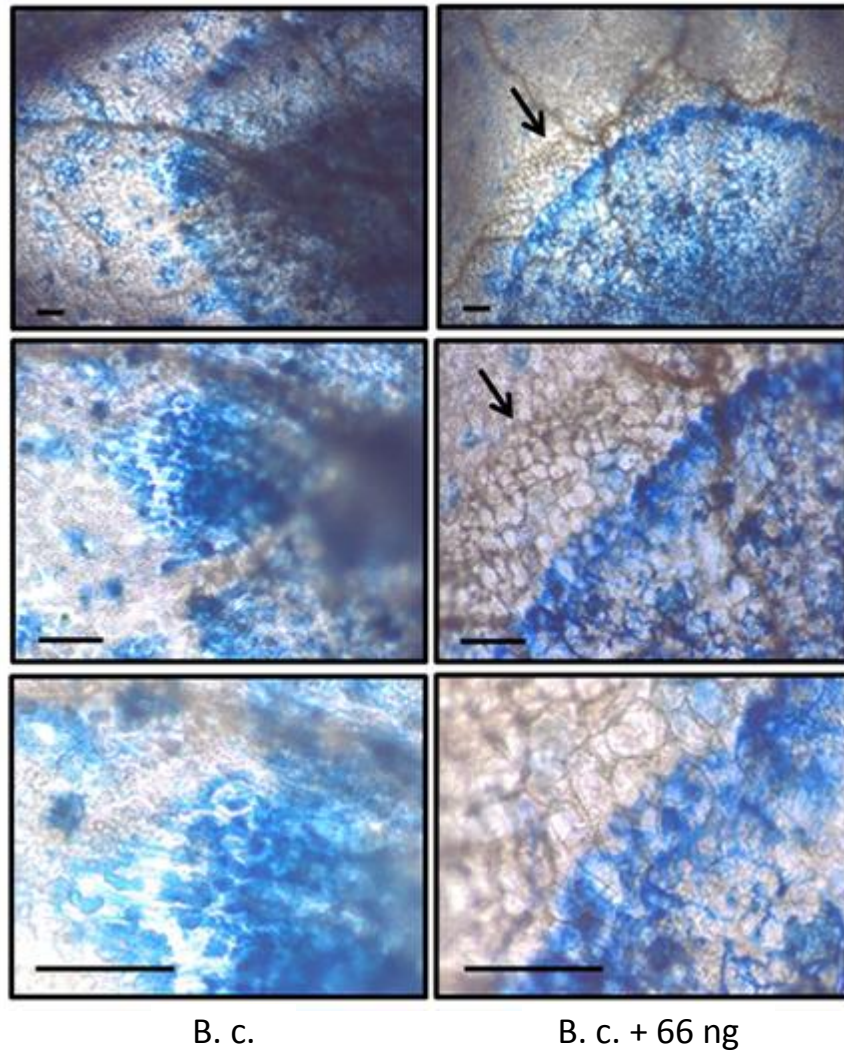


Fig. 55. The effect of electrostatic atomized water particles on gray mold development in tomato leaves. Light microscopy of tomato leaves at 3 dpi.

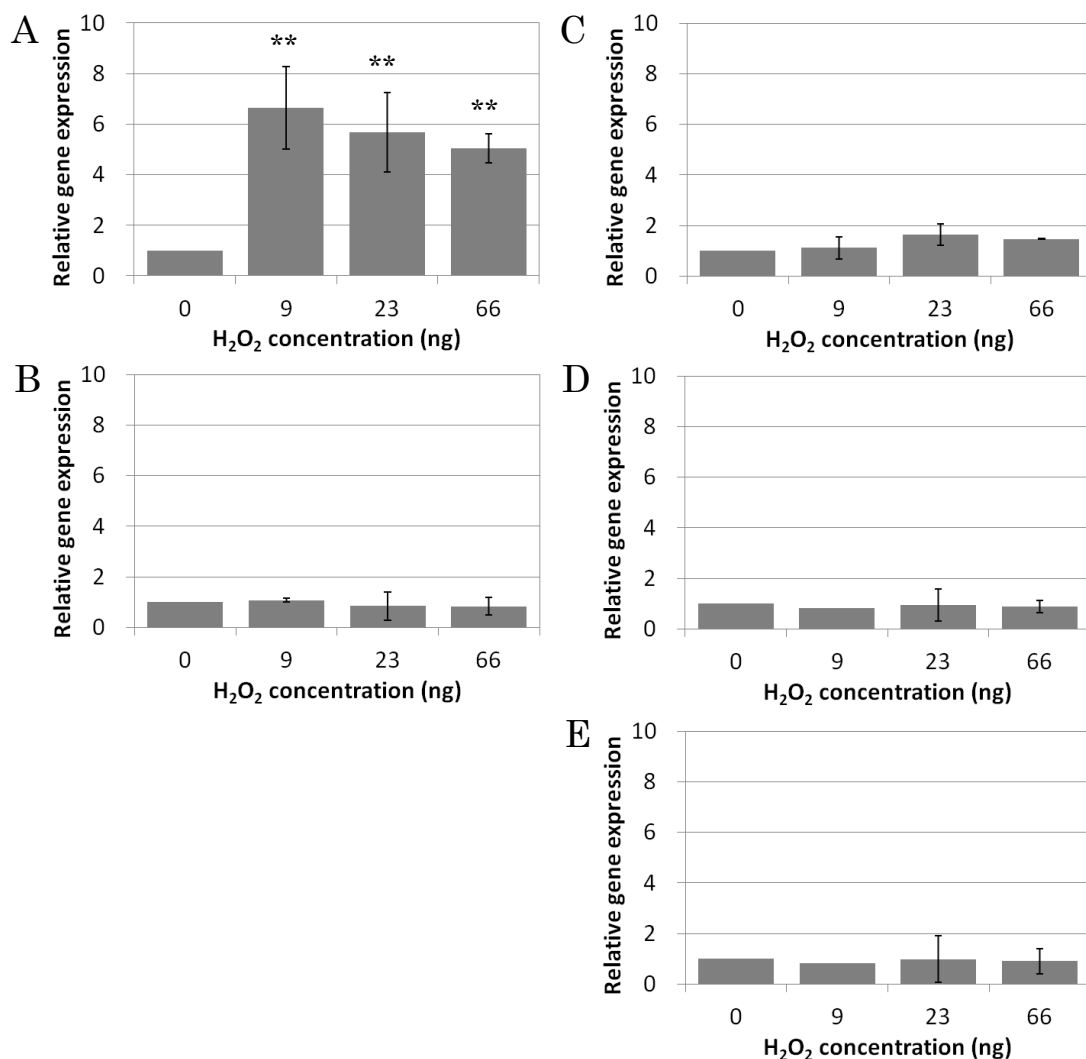


Fig. 56. The effect of electrostatic atomized water particles (EAWP) on the gene expressions involved in nitric oxide synthesis and redox in tomato leaves: *NR* (A), *NOS1* (B), *GPx* (C), *TPx* (D) and *Trx* (E). Error bars indicate standard errors (n = 4) from two independent experiments. Data sets marked with asterisks are significantly different from plants with no EAWP treatment as assessed by a Student's t test; ** indicates P < 0.01.

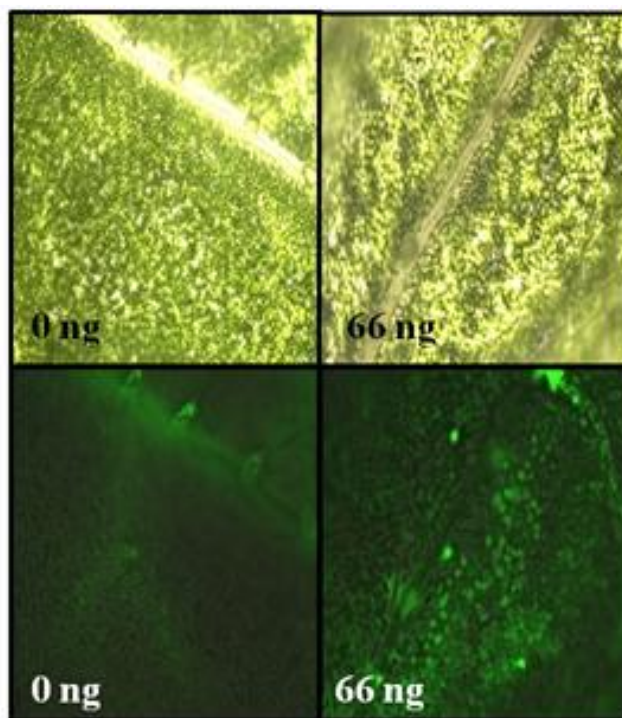


Fig. 57. Accumulation of nitric oxide by electrostatic atomized water particles (EAWP). NO accumulation in tomato leaves with DAF-2DA, after treatment with EAWP ($66 \text{ ng H}_2\text{O}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) for 7 days. Top panels, fluorescence microscopy; bottom panels, light microscopy.

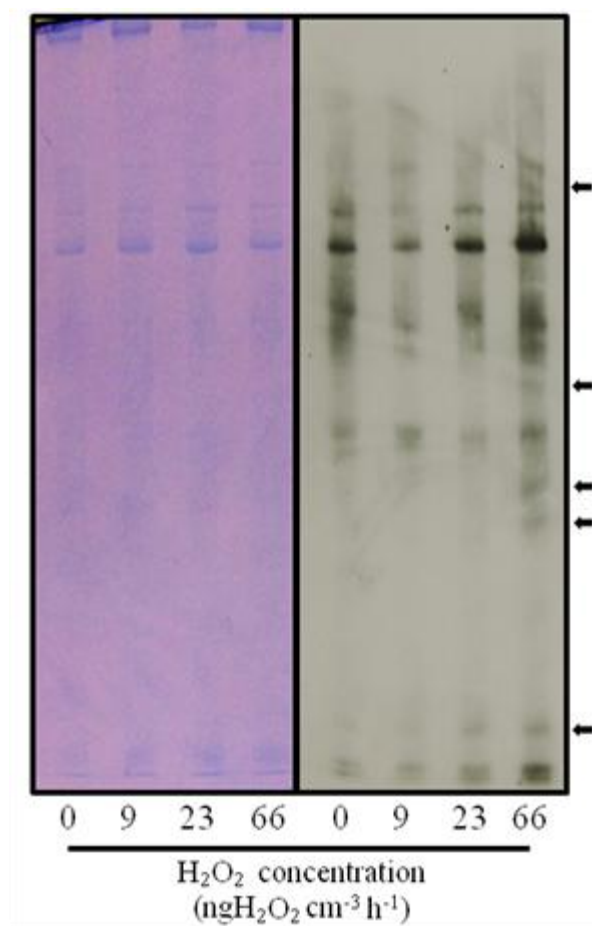


Fig. 58. Accumulation of S-nitrosylated proteins by electrostatic atomized water particles (EAWP). Detection of *S*-nitrosylated proteins of tomato leaf extracts after treatment with EAWP ($66\ ng\ H_2O_2\ cm^{-3}\ h^{-1}$) for 3 days. Biotin-labeled proteins were separated by SDS-PAGE and blotted onto a polyvinylidene difluoride membrane. Detection of *S*-nitrosylated proteins (denoted by arrows) was performed using an anti-biotin antibody (right panel). Left panel, Coomassie blue-stained membrane.

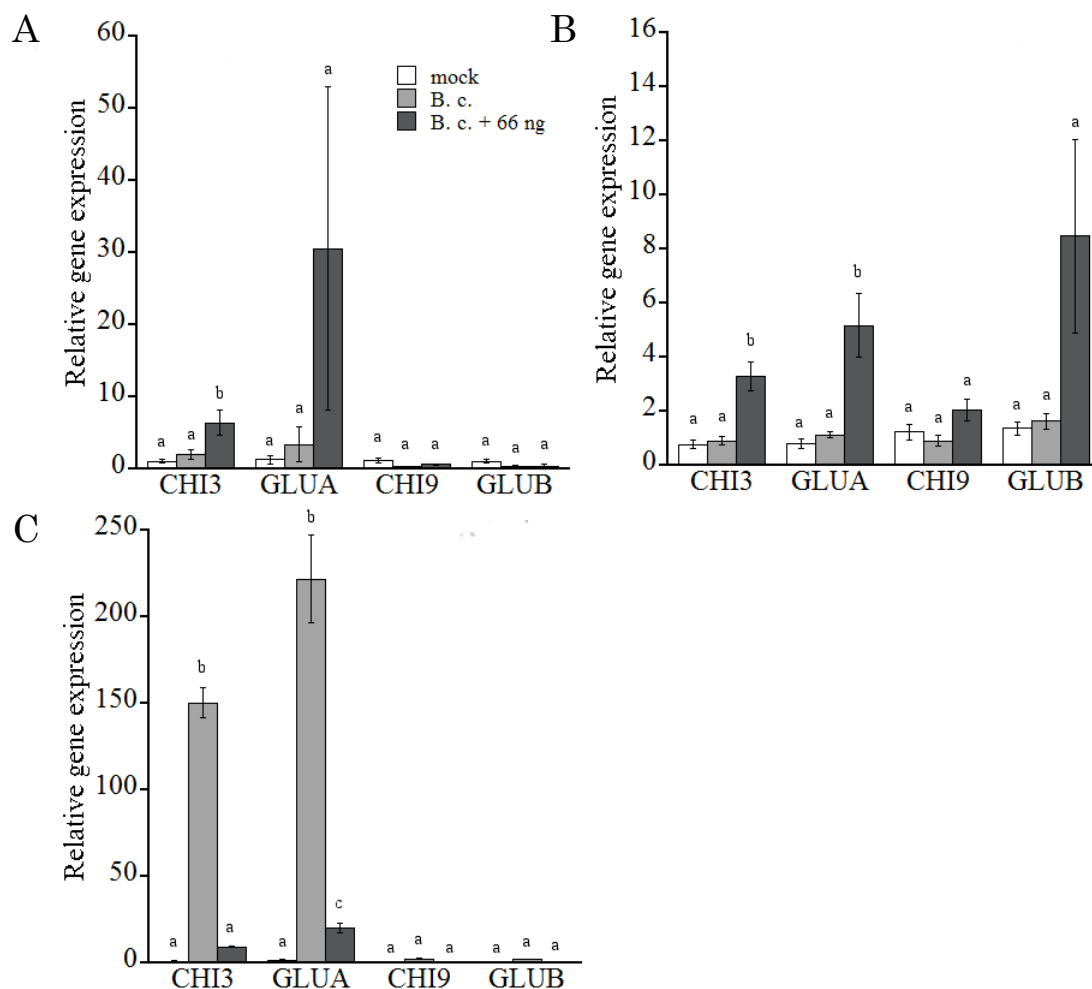


Fig. 59. Quantitative RT-PCR analysis of pathogenesis-related genes at different times after challenge-inoculation with *Botrytis cinerea*. Quantitative RT-PCR analysis of tomato leaves pretreated with (B. c. + 66 ng) or without (B. c.) electrostatic atomized water particles (EAWP). RNA was prepared from tomato leaves 1 h (A), 3 h (B), or 6 h (C) after challenge-inoculation with *B. cinerea*. Error bars indicate standard errors (n = 7) from at least two independent experiments. The statistically significant differences at $P < 0.05$ were analyzed by one-way ANOVA, followed by a Bonferroni multiple comparison test.

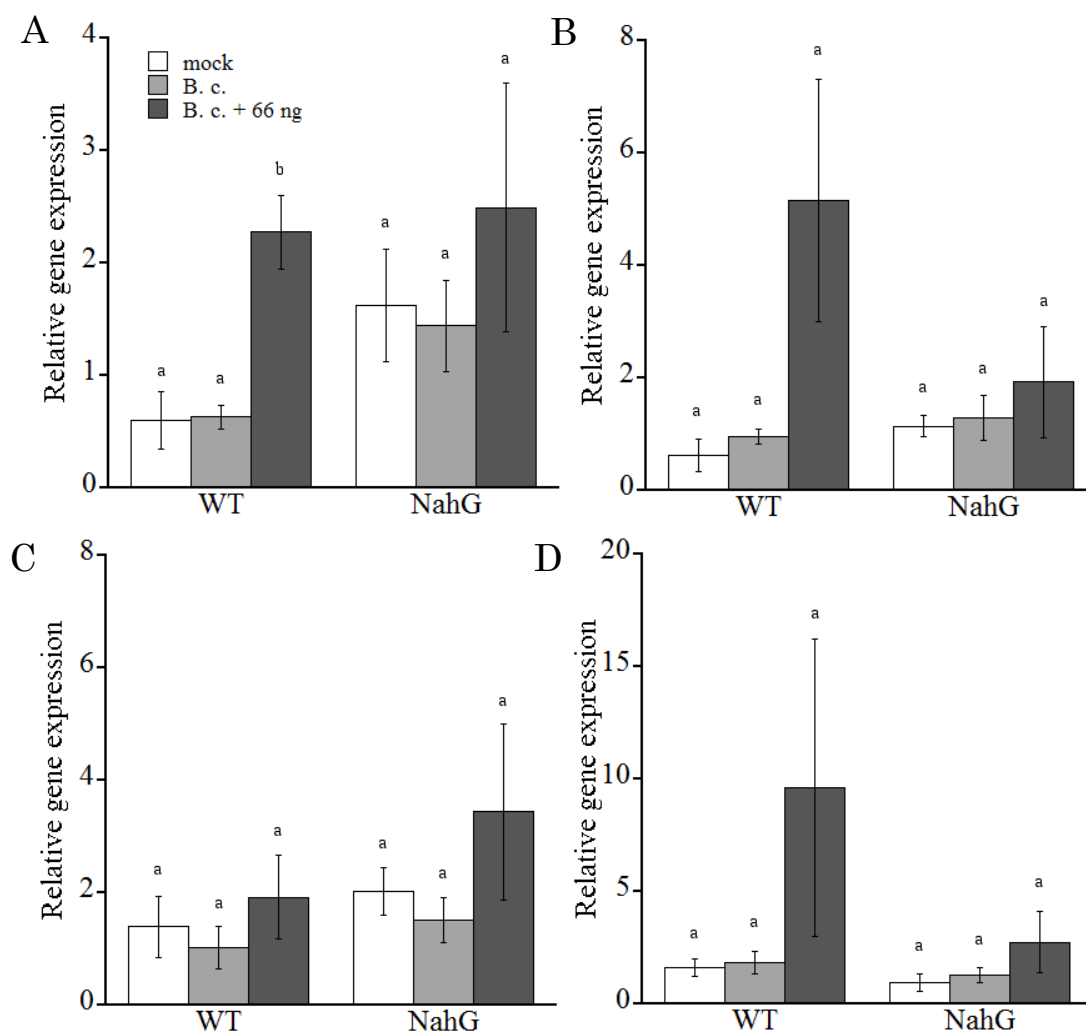


Fig. 60. Quantitative RT-PCR analysis of pathogenesis-related genes at different times after challenge-inoculation with *Botrytis cinerea*. Quantitative RT-PCR analysis of tomato leaves pretreated with (B. c. + 66 ng) or without (B. c.) EAWP in SA-deficient NahG tomato plants. WT, Wild-type tomato plants ('Moneymaker'); NahG, SA-deficient tomato plants. Expression of *Chi3* (A), *GluA* (B), *Chi9* (C) and *GluB* (D) was analysed. Error bars indicate standard errors (n = 4) from at least two independent experiments. The statistically significant differences at $P < 0.05$ were analyzed by one-way ANOVA, followed by a Bonferroni multiple comparison test.

4. 考察

多くの植物種において、*B. cinerea* の感染は主に植物ホルモンを介して複合的な防御応答を誘導する。一般的に、JA および ET を介した応答は *B. cinerea* を含めたネクロトロフィック病原菌に対する抵抗性に深く関与している (Thomma *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1999)。しかしながら、SA シグナル伝達も *B. cinerea* に対する抵抗性に深く関与していることが明らかになっている (Audenaert *et al.*, 2002; Narusaka *et al.*, 2013)。ET あるいは SA の前処理はそれぞれ *CHI9* および *CHI3* の発現を増加させ、病徴の進展を抑制する (Díaz *et al.*, 2002)。本研究では、EAWP 前処理が *B. cinerea* 感染後の迅速な *CHI3* 遺伝子の発現を誘導し、病徴の進展を顕著に抑制することを示した。感染後における *CHI3* 遺伝子の迅速な発現は SA 分解酵素を導入した NahG トマトでは見られなかった。これらの結果は、EAWP 前処理による、病原菌感染後の迅速な抵抗性反応における SA 依存的シグナル伝達の関与を示している。一般的に、植物体内において SA と JA は互いに拮抗的に作用している (Niki *et al.*, 1998)。近年の報告により、*B. cinerea* の感染過程において、SA は nonexpressor of PR genes (NPR1) を介して JA 依存的な抵抗性関連遺伝子 proteinase inhibitors I および II の発現を抑制することにより発病を助長することが明らかとなった (Rahman *et al.*, 2012)。トマトの葉では、*B. cinerea* 感染 (6 hpi) によってサリチル酸シグナル伝達に関与する *TGA1.a* および *TGA2.2* 遺伝子の発現が誘導されるが (Rahman *et al.*, 2012)、本研究においても *B. cinerea* 接種 6 時間後において SA 依存的な *CHI3* 遺伝子の発現が増大していた。これらの結果から、トマトの葉においては *B. cinerea* 接種 6 時間後に SA 依存的な抵抗性が誘導されることが示唆される。注目すべきことに、EAWP を前処理したトマトの葉では無処理のものと比較して非常に素早い (1 hpi) *CHI3* 遺伝子の発現が誘導された。これらの結果は、*B. cinerea* 感染時における迅速な SA 依存的シグナル伝達が EAWP 誘導抵抗性誘導に重要な役割を果たすことを示唆している。

植物の病害抵抗性において、NO は細胞内シグナル伝達因子として重要な役割を果たしている。タバコの葉およびタバコ培養細胞への NO ドナー処理は *PAL* 遺伝子および *PR1* 遺伝子の発現を誘導する (Durner *et al.*, 1998)。加えて、細胞内の NO 蓄積は SNO タンパク質を増加し、SA の増加および SA 依存的な遺伝子発現を誘導する (Loake *et al.*, 2007; Feechan *et al.*, 2005)。本研究において、トマト葉内における NO の蓄積、SNO タンパク質の増加および SA 依存的な防御応答が確

認された。この結果は、EAWP が一般的に知られている植物の抵抗性誘導機構と類似した抵抗性反応を引き起こすことを示唆している。

B. cinerea は宿主の過敏感反応を利用して宿主への効率的なコロニー形成を行う (Govrin *et al.*, 2000)。また、抗酸化物質が *B. cinerea* の発病を顕著に抑制することが複数の作物種において報告されている (Elad, 1992)。これらの結果は、宿主の ROS 量を低下させれば *B. cinerea* の感染を抑制することができることを示唆している。NO は、 $O_2^{\cdot -}$ との反応によって発生するペルオキシナイトライトのような毒性の高いラジカル種に変換されることによって宿主の細胞死を誘導する一方で (Beckman and Koppenol, 1996; Clark *et al.*, 2000)、タンパク質の修飾や ROS への直接的な結合を介して細胞内の酸化還元状態を調節している (Bykova and Rampitsch, 2013; Shi *et al.*, 2007; Qiao *et al.*, 2014)。シロイヌナズナにおいて、NO ドナーの sodium nitroprusside (SNP) 前処理は抗酸化酵素であるカタラーゼおよびグアヤコールペルオキシダーゼの活性を高め、*B. cinerea* の発病を抑制する (Yang *et al.*, 2011)。SNP 前処理は *B. cinerea* 感染後における細胞内の H_2O_2 含量を減少させる (Yang *et al.*, 2011)。Asai ら (2009) は、タバコの葉において *B. cinerea* の侵入時に NO および ROS が蓄積することを報告している。この際、NADPH オキシダーゼ阻害剤の処理は病斑を顕著に減少させたが、NOS 阻害剤の処理は病斑を有意に拡大させた。このことから、NO が *B. cinerea* 誘導性のオキシダティブバーストを負に制御することによって *B. cinerea* に対する抵抗性を強化したことが示唆された (Asai *et al.*, 2009)。本研究では、トマトの葉への EAWP の前処理が NO および SNO タンパク質の蓄積を誘導することを明らかにしたが、この結果は EAWP によってトマト細胞内において NO が生成していることを示している。EAWP 処理したトマトの葉においても、NO が *B. cinerea* 誘導性のオキシダティブバーストを負に制御することによって *B. cinerea* に対する抵抗性を強化しているのかもしれない。

硝酸還元酵素 (NR) は亜硝酸から NO および亜酸化窒素を合成する反応を触媒する (Yamasaki *et al.*, 2000; Rockel *et al.*, 2002)。いくつかの植物種において、組織内の亜硝酸イオン濃度と NR 活性は密接な相関関係を持つことが報告されている (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.*, 2002; Planchet *et al.*, 2005)。本研究で明らかにしたように、EAWP 処理したトマト葉では NR 遺伝子の発現が誘導されている。このことから、EAWP 処理したトマト葉に蓄積する NO は、EAWP に含まれ

ている亜硝酸が NR によって変換されたものと推察される。

EAWP は、超微細なミストであるため、密閉空間であれば一定の濃度を保持することができる。このため、貯蔵中の花卉野菜類に発生する灰色かび病を制御するための新規技術として今後の実用化が期待される。

第4章 405 nm 波長光による植物病害抑制

1. 序論

ポストハーベストにおける貯蔵病害の防除技術として、果実や野菜類の表面殺菌作用を持つ紫外 (UV) 光が利用されている (Ranganna *et al.*, 1997; Marquenie *et al.*, 2002)。施設栽培においても、UV-B 照射が菌への直接的な抗菌作用と植物への抵抗性誘導作用との複合的な影響によってうどんこ病の発病抑制効果を示すことがわかっている (Keller *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2013)。しかしながら、UV 光の照射は皮膚や目への傷害等、人体への悪影響が懸念され使用可能範囲は限定的となる (Young, 2006)。

可視光のうち、LED を光源とした 405 nm 波長光はヒト病原細菌である *Staphylococcus aureus* および *Listeria monocytogenes* に対して高い抗菌活性を示す (Maclean *et al.*, 2008; Endarko *et al.*, 2012)。さらに近年、Murdoch ら (2013) は 405 nm 波長光は糸状菌の *A. niger* に対して抗菌性を有することを明らかにしている。405 nm 波長光は、天然の光増感剤であるポルフィリンを励起させ、一重項酸素を主とした ROS 発生を引き起こして細菌の細胞死を引き起こす (Ashkenazi *et al.*, 2003; Castano *et al.*, 2004)。しかしながら、405 nm 波長光の糸状菌に対する影響はほとんど分かっていない。

菌界において、光は多くの生理的プロセスに関わっており、それらは可視光を含めた様々な波長域を認識する光受容分子によって調節されている (Bell-Pedersen, 2010)。糸状菌のフォトトロピン様タンパク質 WC-1 (White collar-1) は光受容体の一種として知られ、糸状菌の成長および生理的なプロセスに関与している (Corrochano, 2007)。一方、光増感剤の一種であるポルフィリン派生物は一般的に 400 - 420 nm 付近に強い吸収帯を持ち (Soret band)、500 - 650 nm の間に弱い吸収帯を持つ (Reddi and Jori, 1988)。ポルフィリンは真核生物および原核生物で保存されたヘム生合成経路の中間産物であり、細胞内のポルフィリン濃度はヘム合成経路の最初の生成物である 5-アミノレブリン酸 (ALA) の外部処理によって著しく増加する (Nitzan and Kauffman, 1999; Calzavara-Pinton *et al.*, 2012)。興味深いことに、可視光照射によるヒト病原菌 *Candida albicans* および *Trichophyton rubrum* の抗菌作用には内在性ポルフィリンが関与しており、その

作用はALAの外部処理によって促進される (Kamp *et al.*, 2005; Oriel & Nitzan, 2010)。

本研究では、施設栽培やポストハーベストにおいて深刻な被害を引き起こす植物病原糸状菌である *Botrytis cinerea* (Droby and Lichter, 2004)、*Colletotrichum gloeosporioides* (Jeger and Plumbley, 1988)、およびカビ毒の一種であるフモニシンを生産する *Fusarium proliferatum* (Fandohan *et al.*, 2003) に対する 405 nm 波長光の抗菌作用を調査した。また、*B. cinerea* に対する 405 nm 波長光の抗菌作用における内在性ポルフィリンの関与を明らかにするため、孢子発芽および一重項酸素発生におけるALAの影響を調べた。さらに、405 nm 波長光照射によるトマト灰色かび病の発病抑制作用を明らかにするとともに、植物の抵抗性誘導作用について解析した。

2. 材料および方法

1. 供試植物

供試植物として、トマト (*Solanum lycopersicum* L.) (品種：桃太郎)、SA 分解酵素導入変異体 (NahG) およびその野生型である Moneymaker を用いた。トマトの生育は上記 (第 2 章) と同様に行った。また、特に記述がない場合は桃太郎を実験に用いた。メボウキ (*Ocimum basilicum* L.) およびインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) は市販苗を用い、実験に用いるまでトマトと同様の条件で生育した。

2. 供試菌

供試菌として当研究室保存菌株の *B. cinerea* N-2 菌株および *C. gloeosporioides* 58 菌株を用いた。また、*F. proliferatum* (MAFF 236459) は農業生物資源研究所より分与された菌株を用いた。*B. cinerea* の孢子回収および接種は上記 (第 2 章) と同様の方法で行った。

3. LED 光照射条件

本研究では、各波長域にピークを持つ微小な LED を敷き詰めた LED アレイを光源として実験を行った。光源とした LED は Sun-Opto 製 (SL405AAUE, 405-nm light; SL415AAUE, 415-nm light; SL450AANE, 450-nm light) および Nichia 製 (NSPW500GS-K1, 白色光) のものを用いた。光照射は LED アレイを上部に設置した 25°C の環境チャンバ内で行った。また、植物体サンプルを用いた実験では、25°C、12 時間の明期条件 (光量子束密度 $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の環境チャンバ内に設置した 405 nm あるいは白色光の LED 光源を用いた。この際、LED 由来の光照射は明期の間のみ行い、15 分間照射、45 分間非照射を 1 日当たり 12 回繰り返した。サンプルに放射される放射照度 (mW/cm^2) は光量子計 (LI-250A; Meiwafoods) および光量子センサー (LI-190A; Licor) を用い、LED 光の波長特性から算出される光合成光量子束密度を基に算出した。

4. 405 nm 波長光の植物病原糸状菌に対する抗菌性

4 - 1. 可視光照射による植物病原糸状菌の菌糸成長阻害効果の検定

B. cinerea、*C. gloeosporioides* および *F. proliferatum* 保存菌株の菌体をかきと

り、PDA 平板培地上で 3 - 5 日間前培養した。直径 5 mm のコルクボーラーで打ち抜いた菌プラグを新しい PDA 平板培地（直径 90 mm のプラスチックシャーレ）の中央に置き、405 nm 波長光（50 mW/cm²）を環境チャンバ内で連続照射した。コントロールとして、白色光を同様の条件で照射した。405 nm 波長光の照射 120 時間後、菌糸直径を測定した。

可視光による *B. cinerea* 菌糸成長阻害作用の波長特異性を明らかにするため、前培養した *B. cinerea* 菌プラグを SN 平板培地（33 mm プラスチックシャーレ）に接種し、60mW/cm² に調節した各波長光を照射した。

4-2. 405 nm 波長光の *B. cinerea* 孢子発芽に対する影響

SN 培地に懸濁した *B. cinerea* の孢子（1×10⁵ 個/ml）を 96 穴マイクロプレートに分注し、405 nm 波長光を 50 mW/cm² の強度で照射した。コントロールとして、白色光を同様の条件で照射した。孢子発芽率は 3 時間ごとに倒立顕微鏡（Olympus IX70 ; Olympus）を用いて計測した。

4-3. 405 nm 波長光の *B. cinerea* 孢子発芽抑制作用におけるポルフィリンの関与

SN 培地に懸濁した *B. cinerea* の孢子（1×10⁵ 個/ml）を 96 穴マイクロプレートに分注し、最終濃度 0 - 10 mM となるように ALA (Sigma-Aldrich) 混合した。分注後の孢子に 405 nm 波長光を 50 mW/cm² の放射照度で 24 時間照射した。コントロールとして、白色光を同様の条件で照射した。孢子発芽率は倒立顕微鏡（Olympus IX70 ; Olympus）を用いて計測した。

4-4. 405 nm 波長光を照射した *B. cinerea* 孢子内の一重項酸素検出

B. cinerea 孢子内の一重項酸素は Singlet Oxygen Sensor Green reagent (SOSG; Invitrogen) (Flors *et al.*, 2006) を用いて検出した。SN 培地に懸濁した *B. cinerea* の孢子（1×10⁵ 個/ml）に ALA（最終濃度 0 - 10 mM）および SOSG（最終濃度 10 μM）を混合した。その後、*B. cinerea* の孢子を 96 穴マイクロプレートに分注し、405 nm 波長光を 50 mW/cm² の放射照度で 24 時間照射した。コントロールとして、白色光を同様の条件で照射した。照射 3 時間後に孢子を回収し、0.01 M の PBS (pH 7.2) で 2 回洗浄を行った後、蛍光顕微鏡（BZ-9000; BIORREVO, Keyence）を用いて蛍光発生を観察した。一重項酸素依存的な緑色蛍光は GFP-BP

(励起波長 470/40、吸収波長 535/50) BZ フィルタを用いて検出した。各孢子が示す蛍光強度は ImageJ version 1.47 によって定量した (Abramoff *et al.*, 2004)。

5. 405 nm 波長光による植物の病害抵抗性誘導作用

5 - 1. 405 nm 波長光によるトマト切除葉への *B. cinerea* 感染抑制作用

30 日間生育したトマト (Moneymaker) の本葉第 3 葉の切除葉に *B. cinerea* の孢子 (1×10^5 個/ml) を 5 μ l 接種した後、405 nm 波長光を 50 mW/cm² の放射照度で照射した。コントロールとして同様の照射条件の白色光照射を行った。接種 4 日後に病徴を観察し、病斑直径を計測した。

5 - 2. トマト切除葉内の O₂^{•-}および一重項酸素蓄積の検出

405 nm 波長光を照射したトマト切除葉内の O₂^{•-}蓄積を、NBT 染色によって検出した。30 日間生育したトマト (桃太郎) の本葉第 3 葉および第 4 葉の切除葉に 405 nm 波長光を放射照度 50 mW/cm² で照射した。コントロールとして同様の照射条件の白色光照射を行った。照射終了後の切り葉を NBT 溶液に浸漬し、針を除いたシリンジを用いて溶液を組織内に浸透させた。10 分程度インキュベートした後、70~80℃の EtOH 中で組織の脱水を行い、O₂^{•-}との反応によって蓄積するフォルマザンを観察した。

405 nm 波長光を照射したトマト切除葉内の一重項酸素蓄積は SOSG を用いて検出した。30 日間生育したトマト (品種) の第 3 および第 4 葉の切除葉に SOSG をシリンジで浸漬し、405 nm 波長光を放射照度 50 mW/cm² で 1 時間照射した。コントロールとして同様の照射条件の白色光照射を行った。照射終了後、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; BIORIVO, Keyence) を用いて蛍光発生を観察した。一重項酸素依存的な緑色蛍光は GFP-BP (励起波長 470/40、吸収波長 535/50) BZ フィルタを用いて検出した。

5 - 3. トマト切除葉の抵抗性関連遺伝子発現解析

30 日間生育したトマト (桃太郎) の本葉第 3 および第 4 葉の切除葉に 405 nm 波長光を放射照度 60 mW/cm² で 6 時間照射した。この際、抵抗性関連遺伝子発現における O₂^{•-}の関与を明らかにするため、NADPH オキシダーゼ阻害剤 DPI 50 μ M 溶液、スーパーオキシドアニオン消去剤 Tiron 10 mM 溶液、および蒸留水を切り

葉に 1 時間吸収させた後光照射を行った。コントロールとして同様の照射条件の白色光照射を行った。照射終了後、切除葉を液体窒素で凍結させた後 - 80℃で保存した。トマトの chitinase 3 (*CHI3*, Z15141), chitinase 9 (*CHI9*, Z15140), β -1,3-glucanase A (*GLUA*, M80604), β -1,3-glucanase B (*GLUB*, M80608) および Actin (FJ532351) の遺伝子配列からプライマーを設計し、(Table 9) リアルタイム PCR を行った。RNA の抽出、cDNA の合成およびリアルタイム PCR は上記 (第 2 章) と同様の方法で行った。

5 - 4. 405 nm 波長光のシソ科、マメ科植物灰色かび病の抑制効果

メボウキ、インゲンマメの苗に 405 nm 波長光を 50 mW/cm² の放射照度で照射した。コントロールとして同様の照射条件の白色光照射を行った。照射 7 日後、葉に *B. cinerea* の孢子 (1×10⁵ 個/ml) を 5 μ l ずつ接種した。この際、接種後も継続して LED 光を照射した試験区と、接種後は照射を行わない試験区の 2 つの実験系で試験を行った。接種 4 日後に病徴を観察し、病斑直径を計測した。

Table 9. Oligonucleotide primers for analyzing the defense-related gene expression in tomato.

Taget gene	Primer pair	Accession No.	Sequence (5'-3')
PR1	SlPR1-F	M69247	TGTTGTTTCCCTTTGATGTTGCT
	SlPR1-R		AACCTAAGCCACGATACCATGAA
CHI3	SlCHI3-F	Z15141	ACCCGTTGCACTGTCTTGTCT
	SlCHI3-R		AATGGAACCGGCATTTTGTG
CHI9	SlCHI9-F	Z15140	GCGCTGACCAAGCAGCTAAT
	SlCHI9-R		TCCAGGCCACCATTGATGAT
GLUA	SlGLUA-F	M80604	TTTTGGCCATGCTGATGATAAT
	SlGLUA-R		TGCATCGTTTAGCCCTTGTTG
GLUB	SlGLUB-F	M80608	TCGCCACCAACATTCACATAA
	SlGLUB-R		GGCAAGTTGTTCCCCATCAT
Actin	SlAct-F	FJ532351	TGTCCCTATCTACGAGGGTTATGC
	SlAct-R		CAGTTAAATCACGACCAGCAAGA

3. 結果

3 - 1. 405 nm 波長光の *B. cinerea* に対する抗菌性

3 - 1 - 1. 405 nm 波長光照射による植物病原糸状菌の菌糸成長阻害作用

B. cinerea、*C. gloeosporioides* および *F. proliferatum* の菌糸成長は 405 nm 波長光の照射によって顕著に抑制された。供試した 3 菌種のうち、*B. cinerea* は最も高い 405 nm 波長光に対する感受性を示し、白色光を 120 時間照射したものと比較して 405 nm 波長光を照射した *B. cinerea* は 87% の菌糸成長抑制率を示した。一方、405 nm 波長光照射によって *C. gloeosporioides* は 43%、*F. proliferatum* は 64% の菌糸成長抑制率を示した (Fig. 61)。

3 - 1 - 2. 可視光による *B. cinerea* 菌糸成長阻害作用の波長特異性

405 nm 波長光による *B. cinerea* の菌糸成長阻害作用が波長特異的なものかどうか明らかにするため、SN 平板培地に接種した *B. cinerea* 菌プラグに対して 405 nm、415 nm あるいは 450 nm をピークとした LED 光を照射し、菌糸成長の抑制作用を調べた。その結果、450 nm の波長光は *B. cinerea* の菌糸成長に影響を及ぼさなかったが、405 nm および 415 nm の波長光は *B. cinerea* の菌糸成長を顕著に抑制した。また、415 nm の波長光は 450 nm と比較して *B. cinerea* に対する菌糸成長抑制作用を示したが、その影響は 405 nm よりも小さかった (Fig. 62)。

3 - 1 - 3. 405 nm 波長光の *B. cinerea* 孢子発芽抑制作用

405 nm 波長光の *B. cinerea* 孢子発芽抑制作用を調べた。白色光を照射した孢子は照射 6 時間以降に発芽を開始しており、それに対して 405 nm 波長光を照射した孢子は発芽の遅延を示し、照射 9 時間以降に発芽を開始していた。また、405 nm 波長光を照射した *B. cinerea* 孢子は照射 9 - 21 時間後において顕著な発芽の抑制を示した (Fig. 63)。

3 - 1 - 4. 405 nm 波長光の *B. cinerea* 孢子発芽抑制作用におけるポルフィリンの関与

内在性の光感受性物質であるポルフィリンの前駆体 ALA を添加した *B. cinerea* 孢子懸濁液に 405 nm 光を照射し、405 nm 波長光の *B. cinerea* 孢子発芽抑制作用

におけるポルフィリンの関与を調べた。ALA の添加は、いずれの濃度 (0.01 - 10 mM) で処理した際においても白色光照射時の *B. cinerea* 孢子発芽の抑制効果を示さなかった。一方、405 nm 波長光を 24 時間照射した際は 1 mM および 10 mM の ALA を添加した際にそれぞれ 27% および 11% の孢子発芽率を示し 0.1 mM 以下の濃度の ALA を処理した際 (約 70%) と比較して低い孢子発芽率を示した (Fig. 64)。

3 - 1 - 5. 405 nm 波長光による *B. cinerea* 孢子内の一重項酸素蓄積

405 nm の波長光照射による *B. cinerea* 孢子内の一重項酸素蓄積をを用いて調べた。*B. cinerea* 孢子に 405 nm 波長光を照射した際、白色光を照射した際と比較して一重項酸素特異的な蛍光プローブ SOSG の蛍光強度が顕著に増加した (Fig. 65)。また、405 nm 波長光照射による一重項酸素の発生は ALA 濃度依存的な増加を示した (Fig. 65)。高濃度の ALA (10 mM) 添加は、白色光照射時における *B. cinerea* 孢子内の一重項酸素蓄積を引き起こした (Fig. 65)。

3 - 2. 405 nm 波長光による植物の病害抵抗性誘導作用

3 - 2 - 1. 405 nm 波長光によるトマト切除葉への *B. cinerea* 感染抑制作用

405 nm 波長光が植物の灰色かび病抑制効果を示すかどうか明らかにするため、トマト切除葉に *B. cinerea* を接種し、405 nm 波長光を照射した。その結果、405 nm 波長光は接種 4 日後において *B. cinerea* の病徴進展を顕著に抑制した (Fig. 66)。この際、405 nm 波長光照射は明期の期間中に放射照度 50 mW/cm² で 1 時間当たり 15 分間行い、この条件下では PDA 培地上における *B. cinerea* の生育阻害作用はほとんど見られなかった (データ未記載)。

3 - 2 - 2. 405 波長光照射によるトマト切除葉内の O₂^{·-} および一重項酸素蓄積

405 nm 波長光照射によるトマト葉内の O₂^{·-} 蓄積を調べた。トマト切除葉に 405 nm 波長光は白色光照射時と比較して、照射 180 分後をピークとして照射 30 分後以降にトマトの葉に O₂^{·-} 蓄積を誘導した一方で、照射 360 分後における O₂^{·-} の蓄積誘導はほとんど見られなかった (Fig. 67)。また、405 nm 波長光照射によるトマト葉内の一重項酸素蓄積を調べた。その結果、放射照度 50 mW/cm² で 405 nm 波長光を照射したトマトの葉では、白色光を照射したものと比較して顕著な一重項酸素の蓄積を示した (Fig. 68)。

3 - 2 - 3. トマト切除葉の抵抗性関連遺伝子発現解析

405 nm 波長光照射によるトマト切除葉の抵抗性関連遺伝子発現を調べた結果、*CHI3*、*CHI9*、*GLUA* および *GLUB* 遺伝子の発現が 405 nm 波長光照射によって誘導され、特に *CHI9* および *GLUB* 遺伝子は大幅な増加量を示した (Fig. 69)。一方、ROS の一種 $O_2^{\cdot -}$ の除去剤である Tiron および ROS 合成に関与する NADPH オキシダーゼのインヒビターである DPI を前処理したトマト切除葉ではこれらの遺伝子発現増加が抑制された (Fig. 69)。

3 - 2 - 4. 405 nm 波長光のシソ科、マメ科植物灰色かび病の抑制効果

405 nm 波長光のメボウキおよびインゲンマメに対する灰色かび病菌発病抑制作用を調べた。メボウキおよびインゲンマメに対して 405 nm 波長光を 1 週間照射した後に *B. cinerea* を接種し、その後さらに 3 日間 405 nm 波長光を照射した結果、メボウキおよびインゲンマメいずれの葉においても、白色光を照射したものと比較して病斑の顕著な減少を示した (Fig. 70)。次に、405 nm 波長光による植物の抵抗性誘導作用を明らかにするため、メボウキおよびインゲンマメに対して 405 nm 波長光を 1 週間照射した後に *B. cinerea* を接種し、接種後の光照射を行わない場合の灰色かび病発病抑制効果を調べた。その結果、405 nm 波長光の前処理はメボウキの *B. cinerea* による病斑を減少した一方で、インゲンマメの病斑進展の抑制作用を示さなかった。また、その発病抑制作用は接種後にも 405 nm 波長光を照射したものと比較して限定的なものであった (Fig. 70)。

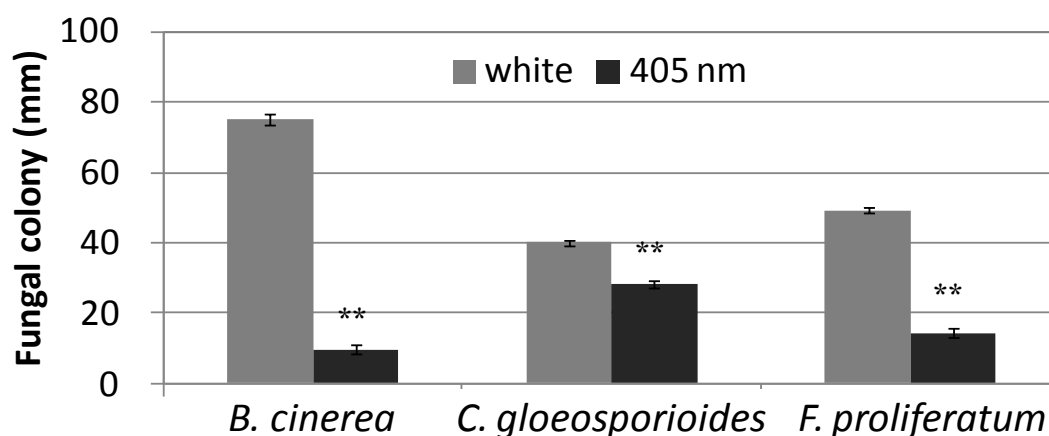


Fig. 61. Inhibition of mycelium growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium proliferatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* by exposure to 405-nm light. The diameter of the colony was measured at 120 h after inoculation. Each column represents an average of colony diameter of at least three biological replicates. Error bars indicate s.d. of the average. Data sets marked with asterisks are significantly different from white, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$.

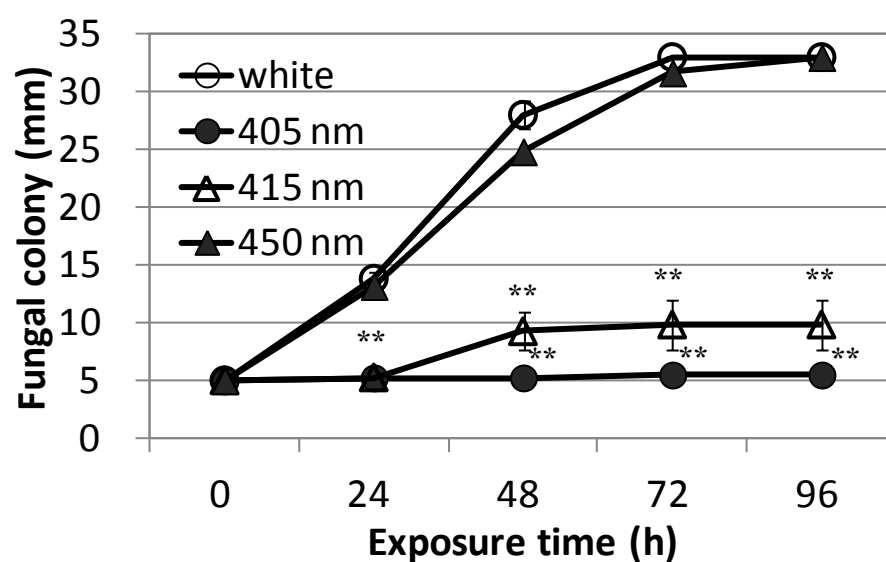


Fig. 62. Effect of light with different-wavelengths on the growth of *Botrytis cinerea*. Each value represents an average diameter of fungal colonies of at least three biological replicates. Error bars indicate s.d. values. Data sets marked with asterisks are significantly different from white, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$.

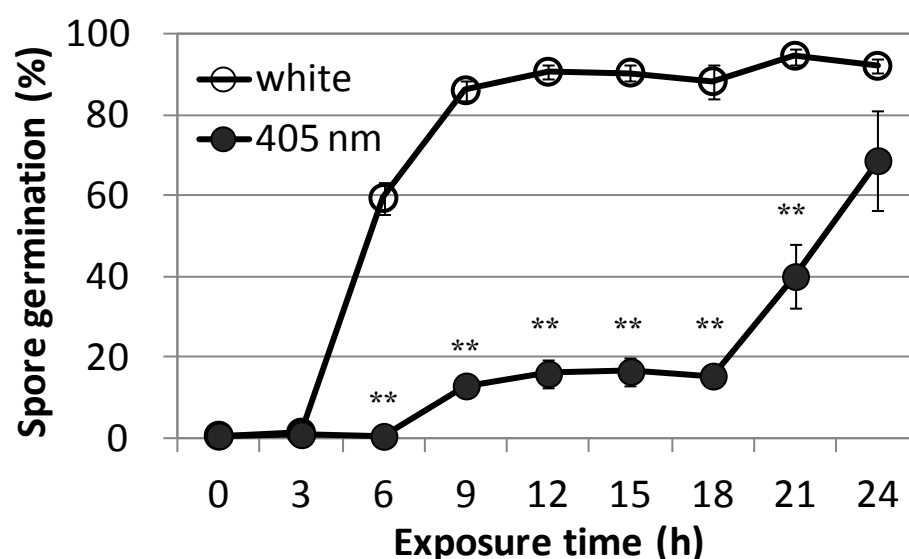


Fig. 63. Inhibition of *Botrytis cinerea* spore germination by exposure to 405-nm light. Values represent the means of three replicates, with at least 50 spores per replication in each treatment. Error bars indicate s.d. values. Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$.

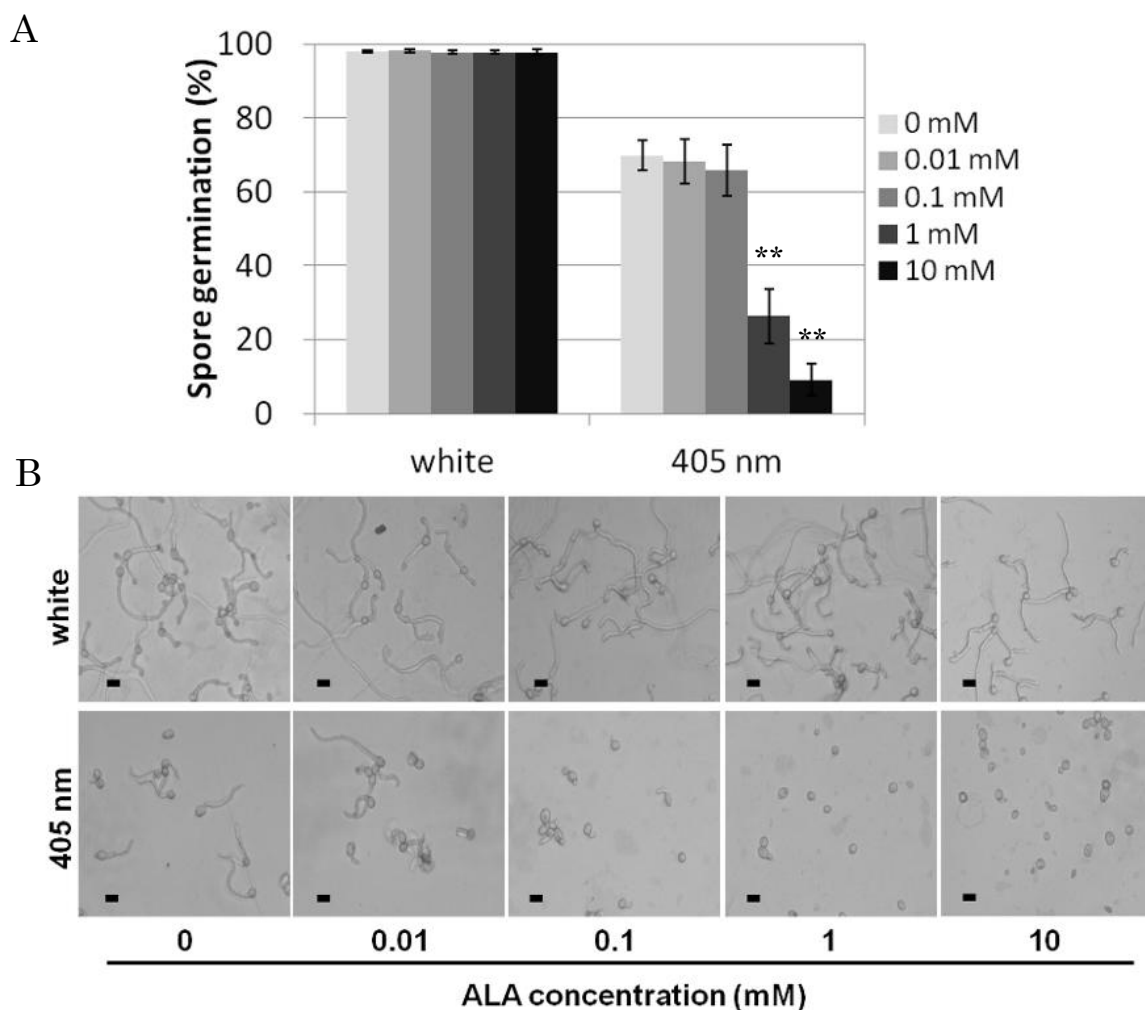


Fig. 64. Effects of 405-nm light and ALA on *Botrytis cinerea* spore germination. (A) Germination rate of *B. cinerea* spores after the exposure to white and 405 nm lights for 24 h in the presence of different concentrations of ALA. (B) Light microscopy of *B. cinerea* spores after the exposure to white and 405-nm lights for 24 h in the presence of different concentrations of ALA. Values represent the means of three replicates, with at least 50 spores per replication in each treatment. Error bars indicate s.d. values. Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$.

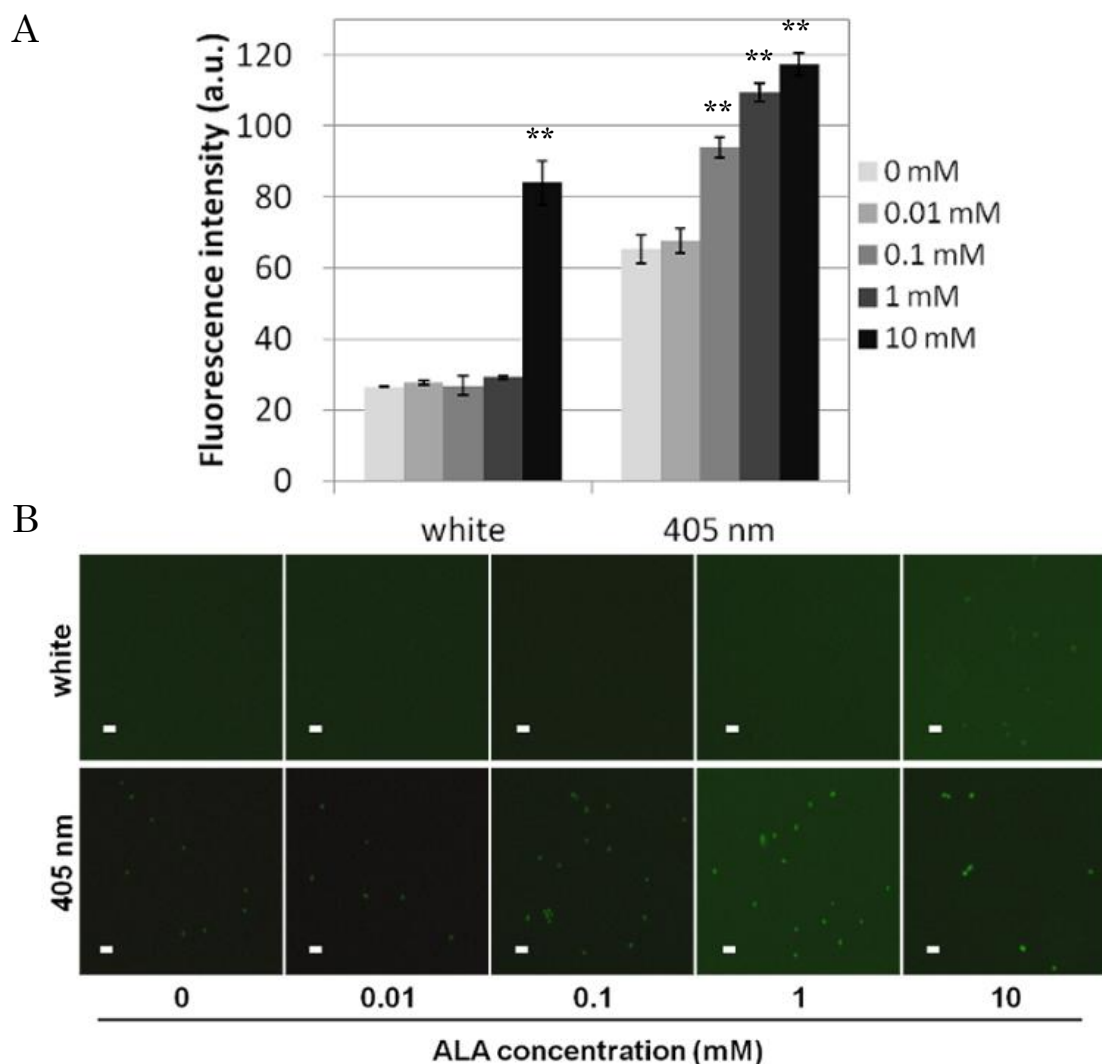


Fig. 65. Detection of singlet oxygen from *Botrytis cinerea* spores exposed to white and 405-nm light and ALA in the presence of different concentrations of ALA. (A) Fluorescence intensity *B. cinerea* spores exposed to white or 405-nm light in the presence of different concentrations of ALA. Values represent the means of two replicates, with at least 50 spores per replication in each treatment. Error bars indicate s.d. values. Data sets marked with asterisks are significantly different from H₂O, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$. (b) Fluorescent microscopy of *B. cinerea* spores exposed to white or 405-nm light in the presence of different concentrations of ALA and stained with SOSG.

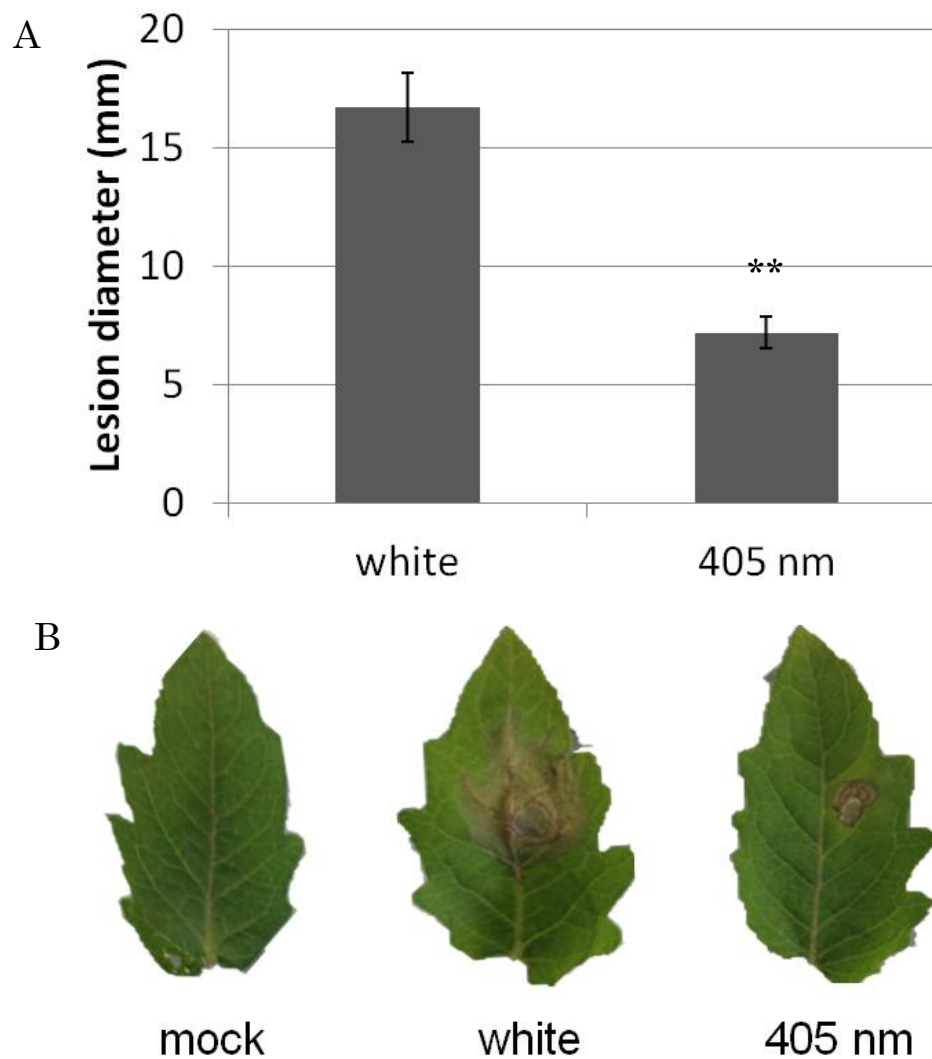


Fig. 66. The effect of 405-nm light on gray mold development in detached tomato leaves. (A) lesion diameter was analyzed 4 dpi (B) and photographs were taken 4 dpi. Error bars represent the standard error ($n = 10$) from two independent experiments. Data sets marked with an asterisk are significantly different from white light-exposed leaves as assessed by Student's t -test; ** indicates $P < 0.01$.

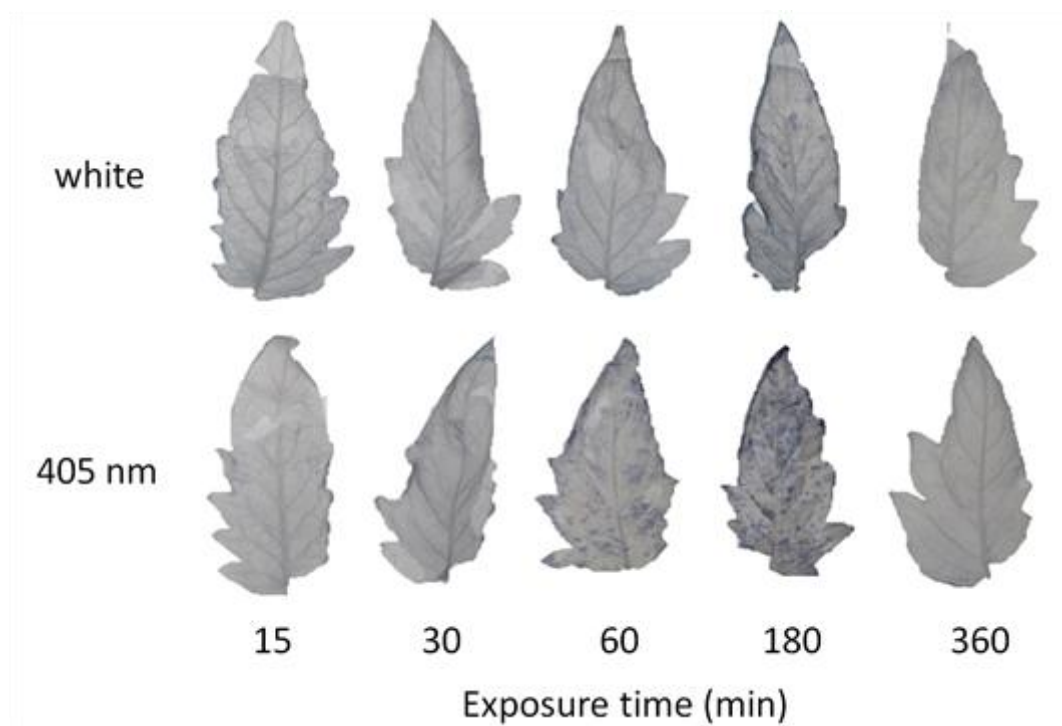


Fig. 67. Accumulation of super oxide radical by 405-nm light. Formazan deposition of tomato leaves treated with 405 nm light or white light for 15, 30, 60, 180, 360 min and stained with NBT.

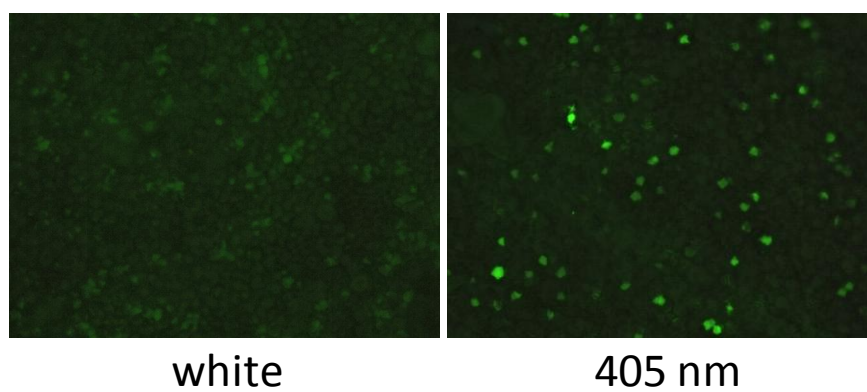


Fig. 68. Accumulation of singlet oxygen by 405-nm light. Singlet oxygen accumulation in tomato leaves with SOSG, after exposed to 405-nm light for 1 h.

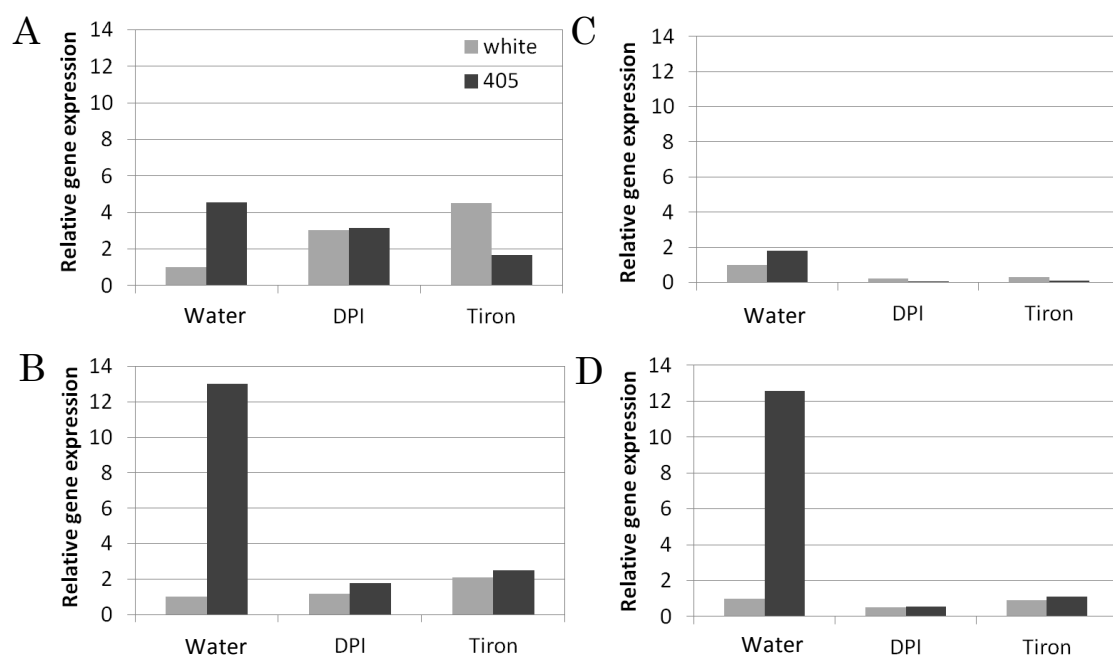
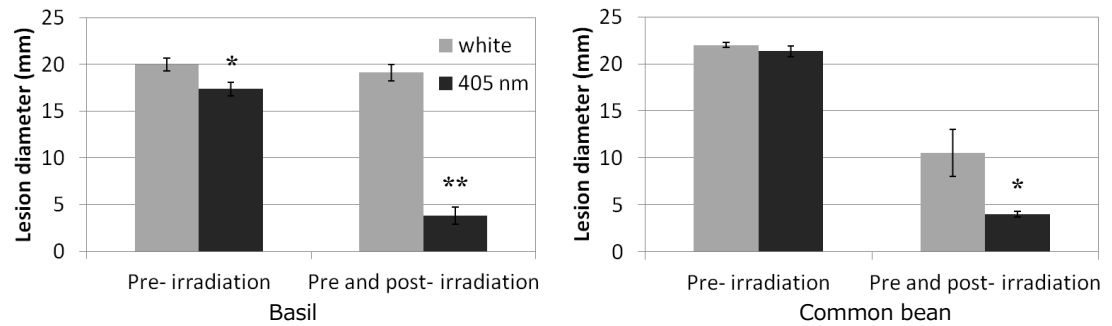


Fig. 69. Expression patterns of defence-related genes in response to 405 nm light. Expressions of *Chi3* (A), *Chi9* (B), *GluA* (C) and *GluB* (D) was assessed in tomato detached leaves at 6 h after exposed to 405-nm or white light. Leaves were pre-treated with water, DPI or Tiron for 1 h before light exposure.

A



B

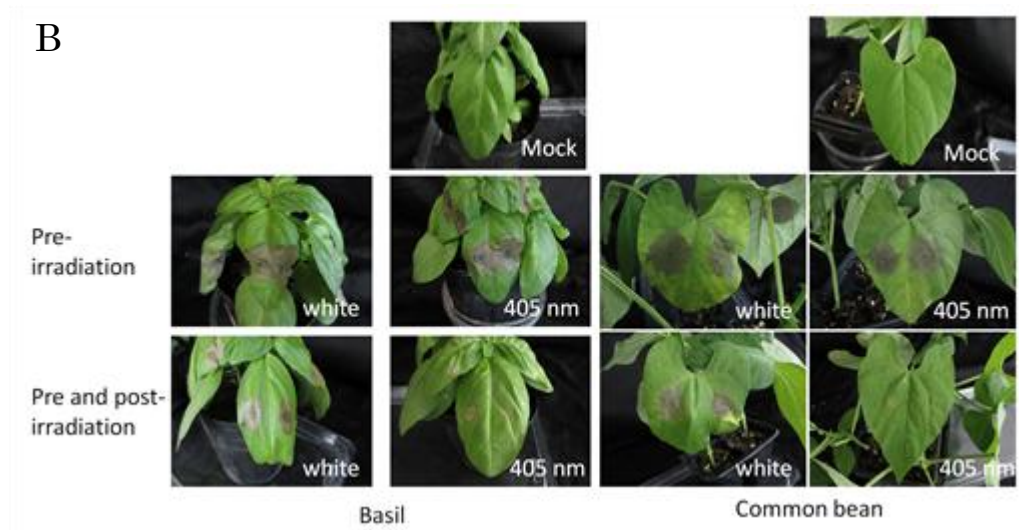


Fig. 70. The effect of 405-nm light on gray mold development in basil and commonbean. (A) Lesion diameter at 4 days post-inoculation. Error bars represent the standard errors ($n = 8$ in basil, $n = 6$ in common bean). (B) Photographs were taken 4 days post-inoculation. Data sets marked with asterisks are significantly different from white, as assessed by a Student's t test; ** indicates $P < 0.01$, * indicates $P < 0.05$.

4. 考察

405 nm 波長光の照射が、経済的に非常に重要な植物病原糸状菌である *B. cinerea*、*C. gloeosporioides* および *F. proliferatum* の生育を顕著に阻害することを明らかにした。その中でも *B. cinerea* は 405 nm 波長光に対して最も高い感受性を示した。*B. cinerea* は広い宿主範囲を持ち、作物の施設栽培やポストハーベストにおいて、世界中で甚大な被害をもたらす重要病原菌である。したがって 405 nm 波長光は、本菌による病害を制御するための有効な技術として期待される。

これまでに様々な波長光と光増感剤との同時処理による抗細菌活性については多くの報告例があるが (Wainwright, 1998; O’Riordan *et al.*, 2005)、糸状菌に対する静菌・殺菌作用についての報告例は非常に少ない。*Aspergillus fumigatus* は光増感剤 Green2W と 630 nm 波長光の併用によって生育が阻害される (Friedberg *et al.*, 2001)。Luksiene ら (2004) は 2.5-71 μ M ヘマトポルフィリン存在下でタングステンランプを照射することにより *Fusarium avenaceum*、*Aspergillus flavus*、および *Trichothecium roseum* の孢子発芽を阻害することを報告している。本研究においては、405 nm 波長光が光増感剤を併用しない条件でも、3 種の糸状菌 (*B. cinerea*、*C. gloeosporioides*、および *F. proliferatum*) に対して顕著な静菌・殺菌作用を示すことを明らかにしたが、この結果はこれらの糸状菌が、405 nm 波長光によって励起される光増感物質を内在していることを示唆している。

ポルフィリンはヘム生合成における中間産物として知られ、多くの真核生物および原核生物で保存されている (Schobert and Jahn, 2002; Franken *et al.*, 2011)。Oriol and Nitzan (2010) は青色光 (407 - 420 nm) の *C. albicans* に対する抗菌性は菌内在性のポルフィリンが関与しており、その抗菌性は 0.03 - 600 mM の ALA および ALA メチルエステルの添加によって強まることを報告している。さらに、Smijs and Pavel (2011) は爪甲真菌症を引き起こす皮膚糸状菌である *T. rubrum* が ALA を併用した広帯域可視光照射によって生育阻害されることを示した。本研究では、*B. cinerea* の菌糸成長は短波長の可視光 (405 nm および 415 nm) 照射によって阻害され、ALA の添加がその作用を強めることを明らかにした。また、*B. cinerea* は青色光である 450 nm 光照射による生育抑制効果をほとんど示さなかった。これらの結果は、主に 400 - 420 nm に吸収域を持つ内在ポルフィリンが 405 nm 波長光による静菌・殺菌作用に関与していることを示唆している。

一般に、ポルフィリンを含め、光増感剤はその吸収波長域に適した光による光励起によって一重項状態から基底状態に戻る間に、項間交差を経て励起三重項状態に変換される。三重項状態の光増感剤は、水素転移や電子の移動によって基底状態へ戻る際に $O_2^{\cdot -}$ やその他フリーラジカルや(Tipe I)、一重厚酸素 (Tipe II) などの ROS を発生し、細胞への重大な傷害や細胞死を引き起こす (Ashkenazi *et al.*, 2003; Castano *et al.*, 2004)。本研究では、405 nm 波長光を照射した *B. cinerea* 胞子内に一重項酸素が蓄積していることを明らかにした。これらのことから、405 nm 波長光の糸状菌に対する静菌・殺菌作用における一重厚酸素などの ROS の関与が示唆される。Baltazar ら (2013) は近年、光増感剤 (トリイジンプルー) を併用した 630 nm 光の照射による *T. rubrum* の制御において ROS だけでなく NO およびペルオキシナイトライトが重要な役割を果たすことを明らかにしている。今後は、405 nm 波長光による糸状菌の抗菌活性における NO およびペルオキシナイトライトの役割についても検討する必要がある。

本研究ではさらに、405 nm 波長光がトマト切除葉における *B. cinerea* の病徴進展を顕著に抑制することを明らかにした。この際、405 nm 波長光照射は明期の期間中に放射照度 50mW/cm^2 で 1 時間当たり 15 分間行い、この条件下では培地上における *B. cinerea* の生育阻害作用はほとんど見られなかった。この結果は、405 nm 波長光がトマトの葉に *B. cinerea* に対する抵抗性を誘導し、その作用が灰色かび病発病を抑制効果の一因となることを示唆している。

植物組織における ROS の発生は *PR* 遺伝子発現の誘導などを引き起こし、病原性に対する抵抗性反応において重要な役割を果たしている (Henry *et al.*, 2013)。本研究において、405 nm 紫色光を照射したトマト切除葉において $O_2^{\cdot -}$ が蓄積することが明らかとなり、この $O_2^{\cdot -}$ は植物の細胞膜に局在する NADPH オキシダーゼに由来することが示唆された。植物の NADPH オキシダーゼ活性化機構については、カルシウムチャンネル活性化とそれに引き続く MAPK カスケード活性化、カルシウムイオンの直接結合、カルシウム結合タンパク質による活性化、小型 G タンパク質の関与などが報告されているが (Sagi and Fluhr, 2006)、405 nm 波長光と NADPH オキシダーゼ活性化の関係についてはまったくわかっていない。この点に関しては今後の検討課題である。

葉緑体チラコイド膜の光化学系 I (PSI) および II (PSII) の反応中心は植物の主要な ROS 発生部位で (Asada *et al.*, 1994)、PSI 酸素の光還元反応によって $O_2^{\cdot -}$

とその不均化反応物の H_2O_2 および O_2 を生成する (Asada *et al.*, 1974)。一方、PSII においては、三重項状態の酸素は同じく三重項状態のクロロフィル反応中心 $^3\text{P680}$ を介して一重項酸素に変換される (Hideg *et al.*, 1998; Telfer *et al.*, 1994)。細胞内に蓄積した一重項酸素は脂質の過酸化や膜破壊を引き起こし、過酸化脂質を前駆体として合成される JA の蓄積を誘導する (Reinbothe *et al.*, 2009)。一般的に、JA シグナル伝達を介した抵抗性反応は *B. cinerea* のようなネクロトロフィックな病原菌に対する抵抗性に深く関与している (Thomma *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1999)。405 nm 波長光が葉緑体チラコイド膜の光化学系 I (PSI) および II (PSII) にどのように作用するのかについても今後検討する必要がある。

本研究により、405 nm 波長光の植物病原糸状菌に対する高い抗菌活性が明らかになり、*B. cinerea* に対する抗菌活性については菌内在性ポルフィリンを介した ROS の関与が示唆された。また、405 nm 波長光は複数の植物種において *B. cinerea* の感染を阻害することが明らかになった。405 nm 波長光の灰色かび病菌の発病抑制効果には、その高い抗菌活性に加えて、405 nm 波長光照射によって蓄積した ROS を介した JA 依存的な抵抗性誘導作用が複合的に作用しているものと考えられる。

第5章 総合考察

本研究で用いた3種の非生物ストレス（MgO ナノ粒子、静電霧化微粒子水、および405 nm 波長光）は、いずれも抗ウイルス活性あるいは抗微生物活性を有することが報告されている。しかしながら、植物病原糸状菌に対する抗菌性はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究ではまずこれらの非生物ストレスの植物病原糸状菌に対する直接的な抗菌作用を調べた。その結果、MgO ナノ粒子は *B. cinerea* の孢子発芽抑制作用を示し、さらに *Colletotrichum* 属菌の孢子発芽および付着器形成を抑制した。MgO ナノ粒子を処理した菌細胞では ROS が急激に発生することから、これが MgO ナノ粒子の抗菌作用に関係していることが示唆された。405 nm 波長光は、*B. cinerea*、*C. gloeosporioides* および *F. proliferatum* の菌糸成長を著しく阻害した。405 nm 波長光のこれら植物病原糸状菌に対する抗菌性には、内在性ポルフィリンの励起によって発生した一重項酸素の発生が関与すると推察された。一方、静電霧化微粒子水（EAWP）は、植物病原糸状菌に対する抗菌性を示さなかった。これらの結果から、植物病原糸状菌に対する抗菌作用は、3種の非生物ストレス間で異なることが推察された。

MgO ナノ粒子、静電霧化微粒子水、および405 nm 波長光は、いずれも複数種の植物病原菌が引き起こす病害の抑制効果を示したが、抗菌作用と同じく、非生物ストレスの種類によって病害発生の抑制機構は異なっていた。

MgO ナノ粒子は、イチゴ炭疽病の病徴進展を顕著に抑制し、シロイヌナズナへの *B. cinerea* 感染を阻害した。この際に、シロイヌナズナロゼット葉への MgO ナノ粒子処理は局所的および全身的な抵抗性反応を誘導し、そのシグナル因子として JA/ET シグナルの関与が示唆された。また、MgO ナノ粒子をトマトおよびシロイヌナズナ地下部へ処理すると胚軸組織内のグルカナーゼおよびチロース蓄積を伴った全身的な抵抗性反応が誘導され、青枯病の病徴進展が抑制された。また、SA シグナル伝達欠損変異体を用いた接種実験の結果から、その全身的な誘導抵抗性における SA シグナル伝達の関与が示唆された。

EAWP は、トマトにおいて葉細胞内の NO および S-ニトロシル化タンパク質の蓄積を誘導した。このような状態の葉に *B. cinerea* を接種すると、SA 依存性 PR タンパク質遺伝子発現が迅速かつ強力に誘導され、灰色かび病の発病が抑制された。このように、あらかじめ植物病原菌の感染に対して強力あるいは迅速に応答できる

ようになっている植物の状態はプライミングと呼ばれている (Conrath *et al.*, 2006)。プライミング様の応答は、MgO ナノ粒子処理によるシロイヌナズナに *R. solanacearum* を接種した際にも観察された。MgO ナノ粒子を前処理したシロイヌナズナに *R. solanacearum* を接種すると、接種 1 日後において *PR1* および *PDF1.2* 遺伝子の発現が顕著に増加した。プライミングは、様々な自然材料あるいは合成材料によって植物に誘導されることがわかっている。例えば非タンパク性アミノ酸である β -アミノ酪酸を前処理したシロイヌナズナは灰色かび病菌に対して抵抗性を示し、プライミング状態となることが示されている (Zimmerli *et al.*, 2001)。また、トウジンビエ種子を NO ドナー (SNP) で処理すると、プライミングが誘導され、べと病菌 *Sclerospora graminicola* に対してする抵抗性が増大する (Manjunatha *et al.*, 2008)。NO は、細胞内シグナル伝達因子として重要な役割を果たしている。タバコの葉およびタバコ培養細胞を SNP で処理すると、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (*PAL*) や *PR1* 遺伝子といった SA シグナル伝達に関与する遺伝子の発現が誘導される (Durner *et al.*, 1998)。本研究においても、トマト培養細胞を MgO ナノ粒子がで処理した際に NO の蓄積が誘導することを明らかにした。これらの結果から、EAWP および MgO ナノ粒子による誘導抵抗性においては、NO および SA が重要な役割をはたしており、プライミングを伴った病害進展の抑制が関与していることが推察される。

抵抗性誘導剤は、環境負荷が少なく、さらに薬剤耐性菌出現の懸念も少ないという優れた特性を持ち合わせた病害防除技術であるが、新規の抵抗性誘導剤開発はあまり進んでいない。最大の理由は、作物に対して薬害が起こることである。これまで多くの生物・非生物ストレスによる植物の抵抗性誘導作用が報告されているが、植物体内のエネルギーが抵抗性に関連するホルモンネットワークなどのシグナル伝達の活性化に過剰に分配されることにより、本来成長に配分されるエネルギーが不足して生育阻害がしばしば引き起こされる (Denancé *et al.*, 2013b)。植物ホルモンは、生物・非生物ストレスに応答した植物の防御応答において主要な役割を果たしており、それらは植物が成長あるいは環境適応を行う際に密接な相互作用により制御されている (Peleg and Blumwald, 2011; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011)。Denancé ら(2013b) は、これまでに報告されている生物・非生物的なストレスによる抵抗性の活性化はエネルギー分配の点で非効率的であるが、これらの報告の多くは限定的な栄養素供給下の実験室内で行われたものであり、栄養素に富んだフィ

ールドでの調査の必要性を述べている。一方、植物のプライミング反応に代表される病原菌の侵入後の抵抗性反応を迅速かつ増大させる誘導抵抗性は、エネルギー配分効率の観点から効率のよい抵抗性の誘導システムである (Denancé *et al.*, 2013b; Walters and Heil, 2007)。この点において、植物にプライミング反応を誘導する MgO ナノ粒子および EAWP は、今後有望な抵抗性誘導技術になる可能性がある。

非生物ストレスは、植物に抵抗性を誘導するものの、化学農薬のように完全に発病を阻害できないことが多い。しかしながら、最近、作用の異なる複数の生物・非生物ストレスを組み合わせることで、より高い防除効果をもたらすことがわかってきた。例えば、トマトへのキトサンとシリコンの併用処理は、*R. solanacearum* 感染後のキチナーゼおよびペルオキシダーゼの遺伝子発現を活性化し、個別の処理と比較してきわめて高い青枯病発病抑制効果を示した (Kiirika *et al.*, 2013)。また、アシベンゾラル S メチルと PGPR (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus pumilus* および *Bacillus subtilis*) の併用処理は、それぞれ単体で処理した場合と比較して *Rhizoctonia solani* が引き起こすアマランスの foliar blight 症状を顕著に減少させた (Nair and Anith, 2009)。本研究では、MgO ナノ粒子、EAWP、および 405 nm 波長光がいずれも病害防除効果を示すことを述べたが、今後はこれらの非生物ストレスと、これまでに報告されている生物・非生物ストレスとの併用による抵抗性誘導機構の知見を蓄積することによって、さらに高い防除効果を有する技術となることが期待される。

本研究によって、MgO ナノ粒子、静電霧化微粒子水、および 405 nm 波長光の病害抑制作用が初めて確認された。また、仮説どおり、これらの非生物ストレスが、ROS あるいは NO の発生を介して植物に作用して病害抵抗性を誘導するということが明らかになった。しかしながら、病害抵抗性誘導機構に関しては不明な点が多く残されており、今後も基礎的な知見の蓄積が必要である。また、将来の応用場面を想定し、実用性の高い病害防除技術を確立するための開発研究も行う必要がある。

摘要

1. 酸化マグネシウム (MgO) ナノ粒子の植物病害抑制作用

MgO ナノ粒子は、*Botrytis cinerea* の孢子発芽および *Colletotrichum* 属菌の付着器形成を顕著に阻害した。MgO ナノ粒子で処理した *B. cinerea* の孢子および *C. gloeosporioides* の菌糸において急速な ROS の発生が見られた。また、MgO ナノ粒子懸濁液にフェニルエーテル型の界面活性剤を添加すると *Colletotrichum* 属菌の孢子に対する殺菌活性が強くなった。MgO ナノ粒子の殺菌活性は、 $O_2^{\cdot -}$ および金属イオンキレーターである Tiron 処理によって阻害された。これらの結果から、MgO ナノ粒子の抗菌作用に ROS および Mg イオンが関与することが示唆された。MgO ナノ粒子のシロイヌナズナへの処理は、局所的なサリチル酸 (SA) あるいはジャスモン酸 (JA) /エチレン (ET) 依存的な PR タンパク質遺伝子の発現を誘導し、さらに全身的な *PDF1.2* 遺伝子発現を誘導した。MgO ナノ粒子処理を処理したシロイヌナズナに *B. cinerea* を接種したところ、MgO ナノ粒子が存在する部位への感染が顕著に阻害され、全身的な *B. cinerea* の感染抑制作用が見られた。

MgO ナノ粒子は、*in vitro* で青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) に対して強い抗菌活性を示したが、接種直後の MgO ナノ粒子処理はトマト青枯病の発病をほとんど抑制しなかった。一方、MgO ナノ粒子のトマトおよびシロイヌナズナへの前処理は青枯病の発病を顕著に抑制した。遺伝子発現解析の結果、MgO ナノ粒子を処理したトマトにおいて局所的小および全身的な SA、JA および ET 依存的抵抗性関連遺伝子の誘導が確認された。MgO ナノ粒子を処理したシロイヌナズナの根部においても SA、JA および ET 依存的抵抗性関連遺伝子の誘導がみられ、さらにアブシジン酸 (ABA) 伝達に関与する *ABF1* 遺伝子の発現も確認された。MgO ナノ粒子を前処理したシロイヌナズナでは *R. solanacearum* 感染初期 (接種後 1 日) において SA 依存的な *PR1*、*PR3* および JA/ET 依存的な *PDF1.2* 遺伝子発現が誘導された。MgO ナノ粒子誘導性の青枯病抑制効果は、SA 蓄積能を失ったトマトおよびシロイヌナズナの変異体ではほとんど見られなかった。また、MgO ナノ粒子を処理したトマトの胚軸組織において β -1,3-glucanase およびチロースの蓄積が観察された。

以上の結果から、MgO ナノ粒子による全身性の誘導抵抗性においては、ラジカル化したポリフェノールあるいは NADPH オキシダーゼを介した ROS の大量発生

と、SA を中心にした植物ホルモンシグナル伝達経路の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

2. 静電霧化微粒子水 (EAWP) による植物病害抑制

EAWP 処理によるトマトの *B. cinerea* に対する抵抗性誘導作用を調べた。EAWP で前処理したトマトに *B. cinerea* を接種すると、灰色かび病の病徴進展が抑制された。EAWP 処理したトマトの葉では、*NR* 遺伝子の発現が増大し、細胞内に NO が誘導されるとともに、ニトロシル化タンパク質が蓄積した。EAWP で前処理したトマトの葉に *B. cinerea* を接種すると、SA 依存性 PR タンパク質遺伝子が迅速に誘導された。また、EAWP で前処理したトマトの葉を顕微鏡観察すると、*B. cinerea* の菌糸の発達が顕著に阻害され、*B. cinerea* 侵入部位周辺の表皮細胞が褐変していた。これらの結果から、EAWP で処理したトマトの葉では、NO および SA 媒介性のシグナル伝達を介した細胞内の酸化還元電位変化により *B. cinerea* の感染初期の増殖を阻害し、発病が抑制されたと考えられた。

3. 405 nm 波長光による植物病害抑制

LED を光源とした 405 nm 波長光の照射は植物病原糸状菌 (*B. cinerea*、*C. gloeosporioides* および *Fusarium proliferatum*) の菌糸成長を抑制し、特に *Botrytis cinerea* に対して強い菌糸成長抑制作用を示した。また、405 nm、415 nm および 450 nm の各波長光を *B. cinerea* に照射したところ、450 nm 波長光は *B. cinerea* の菌糸成長に影響を及ぼさないが、405 nm および 415 nm の波長光は *B. cinerea* の菌糸成長を顕著に抑制した。また、内在性の光感受性物質であるポルフィリンの前駆体として知られる ALA を添加した *B. cinerea* 孢子懸濁液に 405 nm 光を照射すると、ALA 濃度依存的に孢子発芽率が低下した。蛍光プローブによって一重項酸素を検出したところ、ALA 濃度依存的に蛍光強度の増加が確認された。

405 nm 波長光はトマト切除葉における *B. cinerea* の病徴進展を顕著に抑制した。405 nm 波長光をトマト切除葉に照射すると、葉内の $O_2^{\cdot -}$ および一重項酸素の発生が観察された。抵抗性関連遺伝子発現解析の結果、405 nm 波長光を照射したトマト切除葉において SA 依存的および JA/ET 依存的な PR タンパク質遺伝子発現が増加し、とくに JA/ET 依存性 *PR* 遺伝子は NADPH オキシダーゼ阻害剤および $O_2^{\cdot -}$ 除去剤存在下で発現が減少した。これらの結果から、405 nm 波長光が PSII

の反応中心における過剰な光励起、および NADPH オキシダーゼの活性化を介して一重項酸素や $O_2^{\cdot -}$ を誘導し、その結果誘導された JA/ET 依存的な抵抗性が、*B. cinerea* の感染を阻害したことが推察された。

Summary

1. Treatment with magnesium oxide nanoparticles has an antifungal effect and enhances disease resistance

Magnesium oxide nanoparticles (MgO NP) inhibited spore germination of *B. cinerea* and appressorium formation of *Colletotrichum* species. Accumulation of reactive oxygen species (ROS) in spores and hyphal cells was increased by treatment with MgO NP. In species of *Colletotrichum*, fungal cell death was induced by treatment with a combination of MgO NP and a detergent containing a phenyl ether group. This fungicidal effect was inhibited by addition of Tiron, which acts as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) scavenger and a metal ion chelator. In *Arabidopsis thaliana*, expression of salicylic acid (SA)- and jasmonic acid (JA)/ethylene (ET)-dependent pathogenesis-related (*PR*) genes were locally upregulated in leaf tissue after treatment with MgO NP. Additionally, systemic expression of *PDF1.2* was induced by MgO NP. Administration of MgO NP to rosette leaves of *A. thaliana* resulted in local and systemic inhibition of *B. cinerea* infection.

Treatment with MgO NP showed strong activity against the bacterium *Ralstonia solanacearum* *in vitro*. The roots of tomato seedlings were inoculated with *R. solanacearum* and then immediately treated with MgO NP; however, bacterial wilt was scarcely inhibited. In contrast, when roots were drenched with an MgO NP suspension prior to challenge-inoculation with the pathogen, the incidence of disease was significantly reduced. Populations of *R. solanacearum* in the hypocotyls of these plants was also reduced compared to MgO NP-untreated controls, suggesting that pretreatment of the seedlings with MgO NP was essential for the suppression of bacterial wilt. Rapid generation of ROS, such as $O_2^{\cdot-}$ radicals, was observed in roots and cell suspensions of tomato plants treated with MgO NP. Accumulation of ROS following addition of MgO NP to cell suspensions was dependent on NADPH activity and Ca^{2+} concentration. Generation of $O_2^{\cdot-}$ was also observed when tomato plant extracts or polyphenols were added to the MgO NP suspension, suggesting that the generation of $O_2^{\cdot-}$ in tomato roots might be caused by the

activity of NADPH oxidase and the reaction between MgO NP and polyphenols present in the roots. Gene expression analysis showed that SA⁻ and JA/ET-dependent genes were upregulated in both the roots and hypocotyls of tomato plants after administration of MgO NP to the plant roots. Similarly, expression of genes related to SA⁻ and JA/ET, as well as abscisic acid signaling, were increased in roots of *A. thaliana* plants after treatment with MgO NP. Gene expression analysis in the aerial portions of *A. thaliana*, which had been treated with MgO NP, revealed that expression of SA⁻ and JA/ET-dependent genes was enhanced during the early stages (1 dpi) of infection with *R. solanacearum*. The SA signalin-deficient mutants NahG and *sid2-2* showed diminished induced resistance against *R. solanacearum* following treatment with MgO NP. Histochemical analyses showed that β-1,3-glucanase and tyloses accumulated in the xylem and apoplast of pith tissues of hypocotyls after MgO NP treatment.

2. Induction of disease resistance against *Botrytis cinerea* in tomato using electrostatic atomized water particles

Disease development of *B. cinerea* was suppressed by pretreatment with electrostatic atomized water particles (EAWP) prior to pathogen inoculation. Treatment of tomato plants with EAWP resulted in the upregulation of the nitrate reductase gene, which led to the accumulation of nitric oxide and S-nitrosylated proteins in cells. In addition, the SA-dependent chitinase 3 gene was rapidly induced in leaves pretreated with EAWP after the leaves were inoculated with *B. cinerea*. Light microscopy showed browning of epidermal cells surrounding the inoculation sites and inhibition of fungal hyphal development in the cells. These results suggest that pretreatment of tomato leaves with EAWP inhibits the development of *B. cinerea* in the early stages of infection by regulating the redox flux via the NO⁻ and SA-mediated signal transduction pathways.

3. Treatment with 405-nm light has an antifungal effect and enhances disease

resistance

The antifungal effect of 405-nm light generated by a light-emitting diode array on economically important postharvest phytopathogenic fungi was examined. The mycelial growth of *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, and *Fusarium proliferatum* was inhibited by treatment with 405-nm light. *B. cinerea* was most readily inactivated by light at 405 nm and 415 nm and was only slightly inactivated by light at 450 nm, suggesting the presence of a photosensitizing compound that absorbs light mainly at 405–415 nm. Photodynamic inactivation of *B. cinerea* by treatment with 405-nm light was further investigated. Delta-aminolevulinic acid (ALA), a precursor of the endogenous photosensitizer porphyrin, was used to determine the role of porphyrins in 405-nm light-mediated photodynamic inactivation. ALA concentration-dependent inhibition of spore germination and accumulation of singlet oxygen in spores were observed when spores were exposed to 405-nm light. These results suggest that the excitation of endogenous porphyrin and the subsequent accumulation of singlet oxygen contribute to 405-nm light-mediated photodynamic inactivation of *B. cinerea*.

In detached tomato leaves inoculated with *B. cinerea* spores, symptoms were significantly inhibited by irradiation with 405-nm light. Accumulation of singlet oxygen and $O_2^{\cdot -}$ were observed when detached leaves were exposed to 405-nm light. Exposure to 405-nm light induced both SA- and JA/ET-dependent *PR* gene expression, which was suppressed by treatment with NADPH oxidase inhibitors and $O_2^{\cdot -}$ scavengers. The results suggested that accumulation of singlet oxygen and $O_2^{\cdot -}$ induce *PR* gene expression via excess excitation of the photosynthetic reaction centers and/or activation of NADPH oxidase, and thereby enhance disease resistance against *B. cinerea*.

引用文献

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J.** (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36-43.
- Asada, K., Kiso, K., & Yoshikawa, K.** (1974). Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *Journal of Biological Chemistry*, **249**, 2175-2181.
- Asada, K., Foyer, C. H., & Mullineaux, P. M.** (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, 77-104.
- Asai, S., & Yoshioka, H.** (2009). Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**, 619-629.
- Asano, Y., Suda, H., Oue, J., Maekawa, T., & Yamauchi, T.** (2010). Suppression Effect of Nano-Sized Electrostatic Atomized Water Particles on Viruses and Bacteria. *Panasonic Electric Works Technical Report*, **58**, 56-59.
- Ashkenazi, H., Malik, Z., Harth, Y., & Nitzan, Y.** (2003). Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity blue light. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **35**, 17-24.
- Audenaert, K., De Meyer, G. B., & Höfte, M. M.** (2002). Abscissic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology*, **128**, 491-501.
- Baird, M. J., & Lunsford, J. H.** (1972). Catalytic sites for the isomerization of 1-butene over magnesium oxide. *Journal of Catalysis*, **26**, 440-450.
- Baltazar, L. D. M., Soares, B.M., Carneiro, H.C.S., Avila, T.V., Gouveia, L.F., Souza, D.G., Ferreira, M.V.L., Pinotti, M., Santos, D.D.A., & Cisalpino, P.S.** (2013). Photodynamic inhibition of *Trichophyton rubrum*: *in vitro* activity and the role of oxidative and nitrosative bursts in fungal death. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **68**, 354-361.
- Beckman, C.H.** (1966). Cell irritability and localization of vascular infections in plants. *Phytopathology*, **56**, 821-824.
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H.** (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **40**, C1424.
- Bell-Pedersen, D.** (2010). Introduction to special edition on fungal photobiology. *Fungal Genetics and Biology*, **47**, 879-880.

- Bhargava, A., Alarco, J. A., Mackinnon, I. D., Page, D., & Ilyushechkin, A.** (1998). Synthesis and characterisation of nanoscale magnesium oxide powders and their application in thick films of $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{CaCu}_2\text{O}_8$. *Materials Letters* **34**, 133-142.
- Bleecker, A. B., Estelle, M. A., Somerville, C., & Kende, H.** (1988). Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **241**, 1086-1089.
- Bohlmann, H., Vignutelli, A., Hilpert, B., Miersch, O., Wasternack, C., & Apel, K.** (1998). Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene *Thi2.1*, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. *Febs Letters*, **437**, 281-286.
- Brading, P. A., Hammond - Kosack, K. E., Parr, A., & Jones, J. D.** (2000). Salicylic acid is not required for Cf - 2 - and Cf - 9 - dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal*, **23**, 305-318.
- Buddenhagen, I., & Kelman, A.** (1964). Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, **2**, 203-230.
- Bykova, N. V., & Rampitsch, C.** (2013). Modulating protein function through reversible oxidation: Redox - mediated processes in plants revealed through proteomics. *Proteomics*, **13**, 579-596.
- Calzavara - Pinton, P., Rossi, M. T., Sala, R., & Venturini, M.** (2012). Photodynamic Antifungal Chemotherapy †. *Photochemistry and Photobiology*, **88**, 512-522.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R.** (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **1**, 279-293.
- Chen, Y. Y., Lin, Y. M., Chao, T. C., Wang, J. F., Liu, A. C., Ho, F. I., & Cheng, C. P.** (2009). Virus - induced gene silencing reveals the involvement of ethylene - , salicylic acid - and mitogen - activated protein kinase - related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiologia Plantarum*, **136**, 324-335.
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., Bleve-Zecheo T., D'Alessio M., Zambonin P.G., & Traversa, E.** (2005). Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chemistry of Materials*, **17**, 5255-5262.
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D. A., & Klessig, D. F.** (2000). Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 1380-1384.
- Clark, L. J.** (1970). Titanium determination with disodium 4,

- 5-dihydroxybenzene-m-disulfonate (Tiron) in oxalic acid solution. *Analytical Chemistry*, **42**, 694-698.
- Cole, D. L.** (1999). The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protection*, **18**, 267-273.
- Conrath U., Beckers G. J. M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M., Pieterse C. M. J., Poinssot B., Pozo M. J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L. & Mauch-Mani B.** (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 1062-1071.
- Corrochano, L. M.** (2007). Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **6**, 725-736.
- d'Ursel, C.M., Tsuchiya, K., Horita, M., Nozu, Y., Hashimoto, M.** (1999). Production and preliminary characterization of polyclonal and monoclonal antibodies specific to *Ralstonia solanacearum*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **65**, 361.
- Danesh, D., Aarons, S., McGill, G. E., & Young, N. D.** (1994). Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, **7**, 464-471.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., & Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, **394**, 585-588.
- Denancé, N., Ranocha, P., Oria, N., Barlet, X., Rivière, M. P., Yadeta, K. A., Hoffmann, L., Perreau, F., Clément, G., Maia-Grondard, A., van den Berg, G. C., Savelli, B., Fournier, S., Aubert, Y., Pelletier, S., Thomma, B. P., Molina, A., Jouanin, L., Marco, Y., & Goffner, D.** (2013a). *Arabidopsis* wat1 (walls are thin1) - mediated resistance to the bacterial vascular pathogen, *Ralstonia solanacearum*, is accompanied by cross - regulation of salicylic acid and tryptophan metabolism. *The Plant Journal*, **73**, 225-239.
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D., & Molina, A.** (2013b). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 1-12.
- Denny, T. P.** (2007). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Gnanamanickam SS, editor. *Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht, The Netherlands: Springer Publishing. 573-644.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., & Neill, S.** (2002). A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences, **99**, 16314-16318.
- Díaz, J., ten Have, A., & van Kan, J. A.** (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, **129**, 1341-1351.
- Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., & Adibkia, K.** (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, **44**, 278-284.
- Droby, A., & Lichter, A.** (2004). Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y, Williamson B, Tudzynski P & Delen N, eds), pp. 349–367. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Durner, J., Wendehenne, D., & Klessig, D. F.** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 10328-10333.
- Elad, Y.** (1992). The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotium*) in various crops. *Plant Pathology*, **41**, 417-426.
- Elad, Y., & Shtienberg, D.** (1995). *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. *Integrated Pest Management Reviews*, **1**, 15-29.
- Elmore, S.** (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, **35**, 495-516.
- Endarko, E., Maclean, M., Timoshkin, I. V., MacGregor, S. J., & Anderson, J. G.** (2012). High - Intensity 405 nm Light Inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Photochemistry and Photobiology*, **88**, 1280-1286.
- Epple, P., Vignutelli, A., Apel, K., & Bohlmann, H.** (1998). Differential induction of the *Arabidopsis thaliana* *Thi2.1* gene by *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**, 523-529.
- Fandohan, P., Hell, K., Marasas, W. F. O., & Wingfield, M. J.** (2003). Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in Africa. *African Journal of Biotechnology*, **2**, 570-579.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B. W., Wang, Y., Pallas, J. A., & Loake, G. J.** (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 8054-8059.
- Feng, D. X., Tasset, C., Hanemian, M., Barlet, X., Hu, J., Tremousaygue, D., Deslandes, L., & Marco, Y.** (2012). Biological control of bacterial wilt in *Arabidopsis thaliana*

- involves abscissic acid signalling. *New Phytologist*, **194**, 1035-1045.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D. G., Davies, J. M., Dolan, L.** (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, **422**, 442-446.
- Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., and Scott, I. M.** (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**, 241-254.
- Fragkostefanakis, S., Kalaitzis, P., Siomos, A. S., & Gerasopoulos, D.** (2013). Pyridine 2, 4-Dicarboxylate Downregulates Ethylene Production in Response to Mechanical Wounding in Excised Mature Green Tomato Pericarp Discs. *Journal of Plant Growth Regulation*, **32**, 140-147.
- Franken, A. C., Lokman, B. C., Ram, A. F., Punt, P. J., van den Hondel, C. A., & de Weert, S.** (2011). Heme biosynthesis and its regulation: towards understanding and improvement of heme biosynthesis in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**, 447-460.
- Friedberg, J. S., Skema, C., Baum, E.D., Burdick, J., Vinogradov, S.A., Wilson, D.F., Horan, A.D., & Nachamkin, I.** (2001). *In vitro* effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **48**, 105-107.
- Ghareeb, H., Bozsó, Z., Ott, P. G., Repenning, C., Stahl, F., & Wydra, K.** (2011). Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **75**, 83-89.
- Godiard, L., Sauviac, L., Torii, K. U., Grenon, O., Mangin, B., Grimsley, N. H., & Marco, Y.** (2003). ERECTA, an LRR receptor - like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *The Plant Journal*, **36**, 353-365.
- Gottstein, H. D., & Kuc, J. A.** (1989). Induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. *Phytopathology*, **79**, 176-179.
- Govrin, E. M., & Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, **10**, 751-757.
- Grellet Bournonville, C. F., & Díaz - Ricci, J. C.** (2011). Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. *Phytochemical Analysis*, **22**, 268-271.
- Grimault, V., & Prior, P.** (1993). Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Pathology*, **42**,

589-594.

- Grimault, V., Gelie, B., Lemattre, M., Prior, P., & Schmit, J.** (1994). Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **44**, 105-123.
- Hara, M. R., Thomas, B., Cascio, M. B., Bae, B. I., Hester, L. D., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Sawa, A., & Snyder, S. H.** (2006). Neuroprotection by pharmacologic blockade of the GAPDH death cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3887-3889.
- Hassan, M. A., & Abo-Elyousr, K. A.** (2013). Activation of tomato plant defence responses against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* using DL-3-aminobutyric acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology*, **136**, 145-157.
- Hayward, A. C.** (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, **29**, 65-87.
- He, L., Liu, Y., Mustapha, A., & Lin, M.** (2011). Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological Research*, **166**, 207-215.
- Heath, M. C.** (1974). Light and electron microscope studies of the interactions of host and non-host plants with cowpea rust— *Uromyces phaseoli* var. *vignae*. *Physiological Plant Pathology*, **4**, 403-414.
- Henry, E., Yadeta, K. A., & Coaker, G.** (2013). Recognition of bacterial plant pathogens: local, systemic and transgenerational immunity. *New Phytologist* **199**, 908-915.
- Hernández-Blanco, C., Feng, D. X., Hu, J., Sánchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., Berrocal-Lobo, M., Keller, H., Barlet, X., Sánchez-Rodríguez, C., Anderson, L. K., Somerville, S., Marco, Y., & Molina, A.** (2007). Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *The Plant Cell*, **19**, 890-903.
- Hideg, É., Kálai, T., Hideg, K., & Vass, I.** (1998). Photoinhibition of photosynthesis in vivo results in singlet oxygen production detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves. *Biochemistry*, **37**, 11405-11411.
- Hikichi, Y., Nakazawa-Nasu, Y., Kitanosono, S., Suzuki, K., & Okuno, T.** (1999) The behavior of Lux-marked *Ralstonia solanacearum* in grafted tomato cultivars resistant or susceptible to bacterial wilt. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, **65**, 597-603.
- Hirsch, J., Deslandes, L., Feng, D. X., Balagué, C., & Marco, Y.** (2002). Delayed symptom development in ein2-1, an *Arabidopsis* ethylene-insensitive mutant, in

- response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, **92**, 1142-1148.
- Ho, G. D., & Yang, C. H.** (1999). A single locus leads to resistance of *Arabidopsis thaliana* to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* through a hypersensitive-like response. *Phytopathology* **89**, 673–678.
- Horie, M., Fujita, K., Kato, H., Endoh, S., Nishio, K., Komaba, L. K., Nakamura, A., Miyauchi, A., Kinugasa, S., Hagihara, Y., Niki, E., Yoshida, Y., & Iwahashi, H.** (2012). Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics*, **4**, 350-360.
- Hossain, F., Perales-Perez, O. J., Hwang, S., & Román, F.** (2014). Antimicrobial nanomaterials as water disinfectant: Applications, limitations and future perspectives. *Science of The Total Environment*, **466**, 1047-1059.
- Hu, J., Barlet, X., Deslandes, L., Hirsch, J., Feng, D. X., Somssich, I., & Marco, Y.** (2008). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One*, **3**, e2589.
- Huang, L., Li, D. Q., Lin, Y. J., Wei, M., Evans, D. G., & Duan, X.** (2005). Controllable preparation of Nano-MgO and investigation of its bactericidal properties. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **99**, 986-993.
- Hutson, R. A., & Smith, I. M.** (1980). Phytoalexins and tyloses in tomato cultivars infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* or *Verticillium albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology*, **17**, 245-257.
- Ishibashi, K., Masuda, K., Naito, S., Meshi, T., & Ishikawa, M.** (2007). An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 13833-13838.
- Ishihara, T., Mitsuhashi, I., Takahashi, H., & Nakaho, K.** (2012). Transcriptome analysis of quantitative resistance-specific response upon *Ralstonia solanacearum* infection in tomato. *PloS One*, **7**, e46763.
- Iwata, M.** (2001). Probenazole-a plant defence activator. *Pesticide Outlook*, **12**, 28-31.
- Jeger, M. J., & Plumbley, R. A.** (1988). Post-harvest losses caused by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of tropical fruits and vegetables. In *Biodeterioration 7* (pp. 642-646). Springer Netherlands.
- Jiang, S., Yao, J., Ma, K. W., Zhou, H., Song, J., He, S. Y., & Ma, W.** (2013). Bacterial effector activates jasmonate signaling by directly targeting JAZ transcriptional repressors. *PLoS Pathogens*, **9**, e1003715.

- Jin, T., & He, Y. (2011). Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Nanoparticle Research*, **13**, 6877-6885.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Jones, K. H., & Senft, J. A. (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **33**, 77-79.
- Kachroo, A., Lapchyk, L., Fukushige, H., Hildebrand, D., Klessig, D., & Kachroo, P. (2003). Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid- and jasmonic acid-mediated defense pathways in the *Arabidopsis ssi2* mutant. *The Plant Cell Online*, **15**, 2952-2965.
- Kamp, H., Tietz, H. J., Lutz, M., Piazena, H., Sowyrda, P., Lademann, J., & Blume - Peytavi, U. (2005). Antifungal effect of 5 - aminolevulinic acid PDT in *Trichophyton rubrum*. *Mycoses*, **48**, 101-107.
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2009). Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, **14**, 373-382.
- Keller, M., Rogiers, S. Y., & Schultz, H. R. (2003). Nitrogen and ultraviolet radiation modify grapevines' susceptibility to powdery mildew. *Vitis*, **42**, 87-94.
- Kiirika, L. M., Stahl, F., & Wydra, K. (2013). Phenotypic and molecular characterization of resistance induction by single and combined application of chitosan and silicon in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **81**, 1-12.
- Kim, K. J., Sung, W. S., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2008). Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, 1482-4.
- Kim, K. J., Sung, W. S., Suh, B. K., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2009). Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. *Biometals*, **22**, 235-242.
- Klabunde, K. J., Stark, J., Koper, O., Mohs, C., Park, D. G., Decker, S., Jiang, Y., Lagadic, I., & Zhang, D. (1996). Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry. *Journal of Physical Chemistry* **100**, 12142-12153.
- Kobayashi, M., Kanto, T., Fujikawa, T., Yamada, M., Ishiwata, M., Satou, M., & Hisamatsu, T. (2013). Supplemental UV Radiation Controls Rose Powdery Mildew Disease under the Greenhouse Conditions. *Environmental Control in Biology* **51**, 157-163.
- Koper, O. B., Klabunde, J. S., Marchin, G. L., Klabunde, K. J., Stoimenov, P., & Bohra,

- L. (2002). Nanoscale powders and formulations with biocidal activity toward spores and vegetative cells of *Bacillus species*, viruses, and toxins. *Current Microbiology* **44**, 49-55.
- Kulye, M., Liu, H. U. A., Zhang, Y., Zeng, H., Yang, X., & Qiu, D. (2012). Hrip1, a novel protein elicitor from necrotrophic fungus, *Alternaria tenuissima*, elicits cell death, expression of defence - related genes and systemic acquired resistance in tobacco. *Plant, Cell & Environment*, **35**, 2104-2120.
- Kurabachew, H., & Wydra, K. (2014). Induction of systemic resistance and defense-related enzymes after elicitation of resistance by rhizobacteria and silicon application against *Ralstonia solanacearum* in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Crop Protection*, **57**, 1-7.
- Kuncewicz, T., Sheta, E. A., Goldknopf, I. L., & Kone, B. C. (2003) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in mesangial cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, **2**, 156-163.
- Kunkel, B. N., & Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 325-331.
- Kwak, S. Y., Kim, S. H., & Kim, S. S. (2001). Hybrid organic/inorganic reverse osmosis (RO) membrane for bactericidal anti-fouling. 1. Preparation and characterization of TiO₂ nanoparticle self-assembled aromatic polyamide thin-film-composite (TFC) membrane. *Environmental Science & Technology*, **35**, 2388-2394.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamb, H. H., Gates, B. C., & Knözinger, H. (1988). Molecular organometallic chemistry on surfaces: Reactivity of metal carbonyls on metal oxides. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **27**, 1127-1144.
- Lemieux, B., Miquel, M., & Somerville, C. (1990). Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theoretical and Applied Genetics*, **80**, 234-240.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., & Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, **58**, 876-888.
- Leung, Y. H., Ng, A., Xu, X., Shen, Z., Gethings, L. A., Wong, M. T., Chan, C., Guo, M. U., Ng, Y. H., Djurišić, A. B., Lee, P., Chan, W. K., Yu, L. H., Phillips, D. L., Ma, A., & Leung, F. C. (2014). Mechanisms of antibacterial activity of MgO: Non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small* **10**, 1171-1183.

- Liang, S. H., & Gay, I. D.** (1986). A ^{13}C solid-state NMR study of the chemisorption and decomposition of ethanol on MgO. *Journal of Catalysis*, **101**, 293-300.
- Lin, Z., Zhong, S., & Grierson, D.** (2009). Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 3311-3336.
- Lindermayr, C., & Durner, J.** (2009). S-Nitrosylation in plants: pattern and function. *Journal of Proteomics*, **73**, 1-9.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., & Durner, J.** (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **137**, 921-930.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Loake, G., & Grant, M.** (2007). Salicylic acid in plant defense-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 466-472.
- Luksiene, Z., Peculyte, D., & Lugauskas, A.** (2004). Inactivation of fungi *in vitro* by photosensitization: preliminary results. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, **11**, 215-220.
- Maclean, M., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., & Woolsey, G.** (2008). High - intensity narrow - spectrum light inactivation and wavelength sensitivity of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, **285**, 227-232.
- Mahesh, S. K., Liu, H., & Qiu, D. W.** (2012). The role of radical burst in plant defense responses to necrotrophic fungi. *Journal of Integrative Agriculture*, **11**, 1305-1312.
- Mandal, S., Das, R. K., & Mishra, S.** (2011). Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**, 117-123.
- Manjunatha, G., Raj, S. N., Shetty, N. P., & Shetty, H. S.** (2008). Nitric oxide donor seed priming enhances defense responses and induces resistance against pearl millet downy mildew disease. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **91**, 1-11.
- Manners, J. M., Penninckx, I. A., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R. L., Morgan, A., Maclean, D. J., Curtis, M. D., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F.** (1998). The promoter of the plant defensin gene *PDF1.2* from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant Molecular Biology*, **38**, 1071-1080.
- Mano, Y., & Nemoto, K.** (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 2853-2872.
- Marquenie, D., Lammertyn, J., Geeraerd, A. H., Soontjens, C., Van Impe, J. F., Nicolai, B. M., & Michiels, C. W.** (2002). Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and

- Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. International Journal of Food Microbiology, **74**, 27-35.
- Mattson, M. P., & Chan, S. L.** (2003). Calcium orchestrates apoptosis. Nature Cell Biology, **5**, 1041-1043.
- McConn, M., Hugly, S., & Somerville, C.** (1994). A mutation at the *fad8* locus of *Arabidopsis* identifies a second chloroplast [omega]-3 desaturase. Plant Physiology, **106**, 1609-1614.
- Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F., Kaiser, W. M., & Lillo, C.** (2005). Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game?. Photosynthesis Research, **83**, 181-189.
- Milling, A., Babujee, L., & Allen, C.** (2011). *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. PloS One, **6**, e15853.
- Monma, S., Sakata, Y., & Matsunaga, H.** (1997). Inheritance and selection efficiency of bacterial wilt resistance in tomato. Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly, **31**, 195-204.
- Mori, Y., & Fukumoto, Y.** (2002) Production of silica particles by electrostatic atomization. Kona, **20**, 238-245.
- Morot-Gaudry-Talarmain, Y., Rockel, P., Moureaux, T., Quillere, I., Leydecker, M., Kaiser, W., & Morot-Gaudry, J.** (2002). Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. Planta, **215**, 708-715.
- Mucharromah, E., & Kuc, J.** (1991). Oxalate and phosphates induce systemic resistance against diseases caused by fungi, bacteria and viruses in cucumber. Crop Protection, **10**, 265-270.
- Murdoch, L. E., McKenzie, K., Maclean, M., Macgregor, S. J., & Anderson, J. G.** (2013). Lethal effects of high-intensity violet 405-nm light on *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and on dormant and germinating spores of *Aspergillus niger*. Fungal Biology, **117**, 519-527.
- Nair, C., & Anith, K.** (2009). Efficacy of acibenzolar-S-methyl and rhizobacteria for the management of foliar blight disease of amaranth. Journal of Tropical Agriculture, **47**, 43-47.
- Narusaka, M., Yao, N., Iuchi, A., Iuchi, S., Shiraishi, T., & Narusaka, Y.** (2013). Identification of *Arabidopsis* accession with resistance to *Botrytis cinerea* by natural variation analysis, and characterization of the resistance response. Plant Biotechnology, **30**, 89-95.

- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., & Ohashi, Y. (1998). Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology*, **39**, 500-507.
- Nitzan, Y., & Kauffman, M. (1999). Endogenous porphyrin production in bacteria by d-aminolevulinic acid and subsequent bacterial photoeradication. *Lasers in Medical Science* **14**, 269-277.
- 農林水産省 (2005) 総合的病虫害・雑草管理 (IPM) 実践指針. http://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/gaicyu/g_ipm/
- O'Riordan, K., Akilov, O. E., & Hasan, T. (2005). The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2**, 247-262.
- Ohira, T., Yamamoto, O., Iida, Y., & Nakagawa, Z. E. (2008). Antibacterial activity of ZnO powder with crystallographic orientation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **19**, 1407-1412.
- Oriel, S., & Nitzan, Y. (2010). Photoinactivation of *Candida albicans* by its own endogenous porphyrins. *Current Microbiology*, **60**, 117-123.
- Orober, M., Siegrist, J., & Buchenauer, H. (2002). Mechanisms of phosphate-induced disease resistance in cucumber. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 345-353.
- Peleg, Z., & Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**, 290-295.
- Perez, L., Rodriguez, M. E., Rodriguez, F., & Roson, C. (2003). Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. *Crop Protection*, **22**, 405-413.
- Pietrowska, E., Różalska, S., Kaźmierczak, A., Nawrocka, J., & Małolepsza, U. (2014). Reactive oxygen and nitrogen (ROS and RNS) species generation and cell death in tomato suspension cultures—*Botrytis cinerea* interaction. *Protoplasma*, 1-13.
- Planchet, E., Jagadis Gupta, K., Sonoda, M., & Kaiser, W. M. (2005). Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal*, **41**, 732-743.
- Qiao, W., Li, C., & Fan, L. M. (2014). Cross-talk between nitric oxide and hydrogen peroxide in plant responses to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, **100**, 84-93.

- Rahman, T. A. E., Oirdi, M. E., Gonzalez-Lamothé, R., & Bouarab, K.** (2012). necrotrophic pathogens use the salicylic acid signaling pathway to promote disease development in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **25**, 1584-1593.
- Rahman, M. A., Abdullah, H., & Vanhaecke, M.** (1999). Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annuum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Phytopathology*, **147**, 129-140.
- Ranganna, B., Kushalappa, A. C., & Raghavan, G. S. V.** (1997). Ultraviolet irradiance to control dry rot and soft rot of potato in storage. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **19**, 30-35.
- Ranocha, P., Denancé, N., Vanholme, R., Freydier, A., Martinez, Y., Hoffmann, L., Köhler, L., Pouzet, C., Renou, J.P., Sundberg, B., Boerjan, W., & Goffner, D.** (2010). Walls are thin 1 (WAT1), an Arabidopsis homolog of Medicago truncatula NODULIN21, is a tonoplast - localized protein required for secondary wall formation in fibers. *The Plant Journal*, **63**, 469-483.
- Reddi, E., & Jori, G.** (1988). Steady-state and time-resolved spectroscopic studies of photodynamic sensitizers: porphyrins and phthalocyanines. *Research on Chemical Intermediates*, **10**, 241-268.
- Reinbothe, C., Springer, A., Samol, I., & Reinbothe, S.** (2009). Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS Journal*, **276**, 4666-4681.
- Righelato, R. C., Trinci, A. P. J., Pirt, S. J., & Peat, A.** (1968). The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology*, **50**, 399-412.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R., & Jones, J. D.** (2007). Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 372-379.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D.** (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, **49**, 317-343.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., & Kaiser, W. M.** (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 103-110.
- Romero-Puertas M. C. and Delledonne M.** (2003). Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. *The Plant Journal* **55**, 579-83.
- Sagi, M., & Fluhr, R.** (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH

- oxidases. *Plant Physiology*, **141**, 336-340.
- Sakihama, Y., Cohen, M. F., Grace, S. C., & Yamasaki, H.** (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, **177**, 67-80.
- Sawai, J., Kawada, E., Kanou, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T., & Shimizu, M.** (1996). Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **29**, 627-633.
- Sawai, J., Kojima, H., Igarashi, H., Hashimoto, A., Shoji, S., Sawaki, T., Hakoda, A., Kawada, E., Kokugan, T., & Shimizu, M.** (2000). Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**, 187-194.
- Sawai, J., & Yoshikawa, T.** (2004). Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 803-809.
- Scheler, C., Durner, J., & Astier, J.** (2013). Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**, 534-539.
- Schobert, M., & Jahn, D.** (2002). Regulation of heme biosynthesis in non-phototrophic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **4**, 287-294.
- Sequeira, L.** (1965) Origin of indoleacetic acid in tobacco plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **55**, 1232-1236
- Shi, Q., Ding, F., Wang, X., & Wei, M.** (2007). Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**, 542-550.
- Shimokage, T., Saimoto, M., Okumoto, S., Miyata, T., Yamauchi, T.** (2005). Method of analyzing components in fine water droplets generated by electrostatic atomization. Matsushita Electric Works Technical Report, **53**, 11-16.
- Smijs, T. G., & Pavel, S.** (2011). The susceptibility of dermatophytes to photodynamic treatment with special focus on *Trichophyton rubrum*. *Photochemistry and Photobiology*, **87**, 2-13.
- Smirnoff, N.** (1998). Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, **9**, 214-219.
- Spoel, S. H., & Dong, X.** (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, **12**, 89-100.
- Sreeja, S. J.** (2014). Synthetic plant activators for crop disease management. *International Journal of Thesis Projects and Dissertations*, **2**, 19-28.
- Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., & Klabunde, K. J.** (2002). Metal oxide

- nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, **18**, 6679-6686.
- Sudisha, J., Mostafa, A., Tran, L. S. P., & Ito, S.** (2013). Characterization of rhizosphere fungi that mediate resistance in tomato against bacterial wilt disease. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 3829-3842.
- Sun, Q., Rost, T. L., Reid, M. S., & Matthews, M. A.** (2007). Ethylene and not embolism is required for wound-induced tylose development in stems of grapevines. *Plant Physiology*, **145**, 1629-1636.
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., & Dong, X.** (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, **321**, 952-956.
- Talboys, P. W.** (1958). Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of the British Mycological Society*, **41**, 249-260.
- Talboys, P. W.** (1972). Resistance to vascular wilt fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, **181**, 319-332.
- Tan, S., Dong, Y., Liao, H., Huang, J., Song, S., Xu, Y., & Shen, Q.** (2013). Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato. *Pest Management Science*, **69**, 1245-1252.
- Telfer, A., Bishop, S. M., Phillips, D., & Barber, J.** (1994). Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 13244-13253.
- Thomma, B. P., Eggermont, K., Penninckx, I. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F.** (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 15107-15111.
- Thomma, B. P., Eggermont, K., Tierens, K. F. J., & Broekaert, W. F.** (1999). Requirement of Functional *Ethylene-Insensitive 2* Gene for Efficient Resistance of *Arabidopsis* to Infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, **121**, 1093-1101.
- Thoquet, P., Olivier, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Laterrot, H., & Grimsley, N.** (1996a). Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii7996. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, **9**, 826-836.
- Thoquet, P., Olivier, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Prior, P., Anais, G., Mangin, B., Bazin, B., Nazer, R., & Grimsley, N.** (1996b). Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *MPMI-Molecular Plant Microbe*

Interactions, **9**, 837-842.

- Thurston, H. D.** (1976). Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*). In Proceeding of the first international planning conference and workshop on the ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. NC state university, Raleigh (pp. 58-62).
- Tsuji, H., Yagi, F., Hattori, H., & Kita, H.** (1994). Self-Condensation of *n*-Butyraldehyde over Solid Base Catalysts. *Journal of Catalysis*, **148**, 759-770.
- Vallad, G. E., & Goodman, R. M.** (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, **44**, 1920-1934.
- Vidic, J., Stankic, S., Haque, F., Ciric, D., Le Goffic, R., Vidy, A., Jupille, J., & Delmas, B.** (2013). Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, **15**, 1-10.
- Villa, J. E., Tsuchiya, K., Horita, M., Natural, M., Opina, N., & Hyakumachi, M.** (2005). Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. *Journal of General Plant Pathology*, **71**, 39-46.
- Wainwright, M.** (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **42**, 13-28.
- Walters, D., & Heil, M.** (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **71**, 3-17.
- Wang, Y. Q., Feechan, A., Yun, B. W., Shafiei, R., Hofmann, A., Taylor, P., Xue, P., Yang, F.Q., Xie, Z.S., Pallas, J.A., Chu, C.C., & Loake, G. J.** (2009). S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 2131-2137.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. H., & Dong, X.** (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology*, **17**, 1784-1790.
- Wani, A. H., & Shah, M. A.** (2012). A unique and profound effect of MgO and ZnO nanoparticles on some plant pathogenic fungi. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2**, 40-44.
- Watanabe, H., Matsuyama, T., & Yamamoto, H.** (2003). Experimental study on electrostatic atomization of highly viscous liquids. *Journal of Electrostatics*, **57**, 183-197.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., & Pugin, A.** (2003). Plant iNOS: conquest of the Holy Grail. *Trends in Plant Science*, **8**, 465-468.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M.** (2001). Isochorismate

- synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**, 562-565.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A.** (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 561-580.
- Yamamoto, O., Ohira, T., Alvarez, K., & Fukuda, M.** (2010). Antibacterial characteristics of CaCO₃-MgO composites. *Materials Science and Engineering: B*, **173**, 208-212.
- Yamasaki, H., & Sakihama, Y.** (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *Febs Letters*, **468**, 89-92.
- Yamauchi, N., Takamura, K., Shigyo, M., Migita, C. T., Masuda, Y., & Maekawa, T.** (2014). Control of degreening in postharvest green sour citrus fruit by electrostatic atomized water particles. *Food Chemistry*, **156**, 160-164.
- Yamauchi T, Suda H, Matsui Y.** (2007). Development of home appliances using electrostatic atomization. *Journal of Aerosol Research*, **22**, 5-10.
- Yang, H., Zhao, X., Wu, J., Hu, M., & Xia, S.** (2011). The Benefits of Exogenous NO: Enhancing *Arabidopsis* to Resist *Botrytis cinerea*. *American Journal of Plant Sciences*, **2**, 511.
- Yang, P., & Lieber, C. M.** (1996). Nanorod-superconductor composites: a pathway to materials with high critical current densities. *Science*, **273**, 1836-1840.
- Yi, H. S., Yang, J. W., & Ryu, C. M.** (2013). ISR meets SAR outside: additive action of the endophyte *Bacillus pumilus* INR7 and the chemical inducer, benzothiadiazole, on induced resistance against bacterial spot in field-grown pepper. *Frontiers in Plant Science*, **4**.
- Young, A. R.** (2006). Acute effects of UVR on human eyes and skin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **92**, 80-85.
- Yun, B. W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N. B., Le Bihan, T., Yu, M., Moore, J. W., Kang, J. G., Kwon, E., Spoel, S. H., Pallas, J. A., & Loake, G. J.** (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, **478**, 264-268.
- Zhu, S. Y., Yu, X. C., Wang, X. J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R. C., Shang, Y., Du, S. Y., Wang, X. F., Wu, F. Q., Xu, Y. H., Zhang, X. Y., & Zhang, D. P.** (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, **19**, 3019-3036.
- Zimmerli, L., Métraux, J. P., & Mauch-Mani, B.** (2001). β -Aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* **126**, 517-523.

Zurbriggen M.D., Carrillo N., Tognetti V.B., Melzer M., Peisker M., Hause B. and Hajirezaei M. (2009). Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. The Plant Journal, **60**, 962-973.

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました山口大学農学部 伊藤真一教授に深く感謝の意を表します。また研究を遂行するにあたり、有益な御助言ならびに御支援をいただいた山口大学農学部 田中秀平教授、鳥取大学農学部 児玉基一朗教授、山口大学農学部 荊木康臣教授、山口県産業技術センター 吉村和正博士、山口県農林総合技術センター鍛冶原寛博士、パナソニック株式会社前川哲也氏、榊田幸広氏、宇部マテリアルズ株式会社 境昭二博士に厚く御礼申し上げます。そして、研究を行うにあたり、多大な協力を頂いた学生諸氏に合わせて御礼申し上げます。

本論文の基礎となった学会誌公開論文リスト

学術論文

Imada, K., Tanaka, S., Masuda, Y., Maekawa, T., & Ito, S. (2015). Induction of disease resistance against *Botrytis cinerea* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by using electrostatic atomized water particles. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **89**, 1-7. (published on line) (第3章に記載)

Imada, K., Tanaka, S., Ibaraki, Y., Yoshimura, K., & Ito, S. (2014). Antifungal effect of 405-nm light on *Botrytis cinerea*. *Letters in Applied Microbiology*, **59**, 670-676. (第4章に記載)